

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**Scienze Veterinarie**

**Ciclo XXVI**

**Settore Concorsuale di afferenza: 07/H5**

**Settore Scientifico disciplinare: VET/09**

**EFFICACIA CLINICA DELLO STANOZOLOLO  
INTRARTICOLARE NELLA TERAPIA  
DELL'OSTEOARTROSI DI GOMITO NEL CANE**

**Presentata da: FABIO CARLI**

**Coordinatore Dottorato**

**Relatore**

**Prof. CARLO TAMANINI**

**Prof.ssa STEFANIA PINNA**

**Esame finale anno 2014**

## Sommario

<b>MOTIVAZIONI DELLO STUDIO.....</b>	<b>1</b>
<b>ANATOMIA DELL'ARTICOLAZIONE DEL GOMITO.....</b>	<b>2</b>
<b>IL GOMITO: UN ARTICOLAZIONE SINOVIALE .....</b>	<b>5</b>
CARTILAGINE ARTICOLARE.....	6
LA CELLULARITA' DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE : IL CONDROCITA .....	9
IL CONTENITORE DELL'ARTICOLAZIONE: LA CAPSULA SINOVIALE.....	12
I CONTENUTI: LIQUIDO E MEMBRANA SINOVIALE .....	13
IL SOSTEGNO: L'OSSO SUBCONDRALE .....	20
DINAMISMO DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE .....	20
<b>LA MALATTIA DELL'ARTICOLAZIONE: L'OSTEOARTRITE .....</b>	<b>22</b>
TERAPIA DELL'OSTEOARTRITE.....	30
FANS (farmaco anti-infiammatorio non steroideo) .....	31
GLICOSAMINOGLICANI (GAG).....	34
CORTICOSTEROIDI .....	35
<b>STEROIDI ANABOLIZZANTI .....</b>	<b>35</b>
STANZOLOLO .....	37
<b>PARTE SPERIMENTALE .....</b>	<b>44</b>
INTRODUZIONE .....	44
MATERIALI E METODI.....	45
CRITERI DI INCLUSIONE .....	47
CRITERI DI ESCLUSIONE .....	47
TRATTAMENTO .....	48
Prodotto test - GRUPPO S .....	48
Prodotto di controllo- GRUPPO T.....	49
Prodotto test e prodotto di controllo - GRUPPO ST.....	49
PROCEDURA OPERATIVA.....	50
Visita di inclusione e inizio del trattamento (T 0) .....	50
Somministrazione dei trattamenti nei tre gruppi di studio .....	51
Valutazione dell'andamento clinico.....	52
Sedazione .....	53
Esame Radiografico del gomito.....	53

Procedura SOP per l'attribuzione del punteggio radiografico .....	54
Infiltrazione articolare del gomito .....	55
Valutazione del grado di zoppia .....	55
Risposta alle manipolazioni passive dell'articolazione (punteggio 0-4) .....	56
Viscosità del liquido sinoviale (espressa in cm) .....	57
Quantità del liquido sinoviale (0-2) .....	57
Valutazione dell'ectasia capsulare (0-2) .....	57
Range of Motion (ROM) .....	58
<b>RISULTATI.....</b>	<b>59</b>
STATISTICA DESCRITTIVA .....	59
ZOPPIA.....	64
RISPOSTA ALLE MANIPOLAZIONI .....	70
VISCOSITA' .....	73
QUANTITA' DI LIQUIDO SINOVALE .....	75
VALUTAZIONE RADIOGRAFICA.....	76
ECTASIA CAPSULARE .....	76
RANGE OF MOTION.....	77
INTENSIFICAZIONE ZOPPIA POST SOMMINISTRAZIONE .....	79
STATISTICA INFERENZIALE.....	80
TRATTAMENTO GRUPPO S.....	81
TRATTAMENTO GRUPPO T .....	81
GRUPPO DI TRATTAMENTO ST.....	82
<b>DISCUSSIONI E CONCLUSIONI.....</b>	<b>83</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>90</b>

## **MOTIVAZIONI DELLO STUDIO**

Il lavoro nasce dal desiderio di verificare l'efficacia dello stanozololo, per la terapia dell'osteoartrosi (OA) del gomito nel cane.

Molti Autori ne descrivono i suoi effetti benefici sui tessuti articolari con prove "in vitro" ed "in vivo" nell'uomo e su modelli ovini ed equini. Recenti prove pre-cliniche svolte in questa direzione hanno dimostrato una riduzione delle lesioni dei tessuti articolari ed un conseguente miglioramento clinico dei modelli ovini a cui era stata indotta un artropatia, dopo somministrazione intrarticolare di stanozololo. Lo stanozololo (Sungate®) nella specie equina, è già utilizzato con successo per la terapia dell'artropatia degenerativa articolare (degenerative joint disease-DJD), ed in medicina umana esistono sufficienti dati che dimostrano l'efficacia dello stanozololo nel promuovere i processi riparativi dei tessuti cartilaginei danneggiati da patologia osteoartrosica.

I risultati ottenuti "in vitro" su modelli ovini e su prove in campo sulla specie equina, ne giustificano l'indagine nell'OA del gomito del cane.

## **ANATOMIA DELL'ARTICOLAZIONE DEL GOMITO**

Le articolazioni omeroradiale, omeroradioulnari, e radioulnare prossimale si combinano per formare l'articolazione composta del gomito che si può definire come un articolazione sinoviale a cardine. (Evans, 1993) . L'articolazione omeroradiale si verifica tra il capitello omerale e la testa del radio ed è responsabile per la massima parte della trasmissione delle forze di sostegno del peso. La troclea omerale e la fossa dell'olecrano si articolano, rispettivamente, con l'incisura semilunare e il processo anconeale dell'ulna. Le articolazioni ossee e i legamenti collaterali stabilizzano e limitano il movimento principalmente al piano sagittale, in particolare quando l'articolazione si estende oltre i 90°. A questo punto, il processo anconeale si inserisce nella fossa dell'olecrano e contribuisce alla stabilità dell'articolazione. L'articolazione radio-ulnare prossimale, permette un limitato grado di supinazione e pronazione.

Gli epicondili mediale e laterale dell'omero sono le origini rispettivamente, per i gruppi muscolari flessori ed estensori dell'avambraccio e servono anche come sedi per l'inserzione prossimale per i legamenti collaterale mediale e laterale (Evans, 1993). Il muscolo estensore digitale laterale si trova direttamente sopra l'inserzione epicondilare del legamento collaterale laterale, mentre l'origine del legamento collaterale mediale è situata profondamente, a livello del flessore radiale del carpo. Poiché i legamenti collaterali decorrono distalmente, essi si dividono in peduncolo craniale e caudale. I peduncoli craniali si attaccano principalmente al radio prossimale. I peduncoli caudali si diramano a ventaglio e si attaccano all'ulna laterale, o al radio caudale, al legamento anulare e allo spazio interosseo.

Altre strutture legamentose intrarticolari sono i legamenti anulare olecranico ed obliquo. La capsula articolare è comune a tutte le articolazioni e si inserisce vicino alla cartilagine articolare su tutte le superfici eccetto cranialmente dove aderisce prossimalmente al foro sopratrocleare.

La vascolarizzazione delle articolazioni sinoviali è molto ricca. Le arterie e le vene si inseriscono nel connettivo peri-articolare della membrana sinoviale formando reti sovrapposte e stratificate e ad ogni livello il ramo arterioso è accompagnato da due o tre vene di piccolo calibro.

La rete della lamina propria è molto densa nelle aree ricche di cellule. Da questa rete partono dei ciuffi vascolari che arrivano fino ai villi sinoviali (Evans, De Lahunta, 2013).

Queste reti vascolari della capsula si anastomizzano con quelle del periostio a livello della giunzione dei due settori.

I vasi linfatici sono disposti su due piani, uno in contatto con la faccia profonda della capsula fibrosa e una nella lamina propria della sinoviale. Attorno all'articolazione vi è una rete di efferenti con maglie molto ampie che viene successivamente drenata dai vasi linfatici che affiancano le arterie e le vene della regione. E' importante sottolineare che tra i linfatici e la cavità sinoviale non esiste nessun tipo di comunicazione (Barone, 2004).

Le articolazioni sinoviali dispongono di un'innervazione molto abbondante. I nervi si accostano molto spesso ai vasi sanguigni e diramano le loro numerose fibre in due strati plessiformi, uno dei quali è molto fitto sotto la sinoviale mentre l'altro è a maglie larghe nella capsula fibrosa. L'articolazione del gomito dispone, oltre ad una grande quantità di terminazioni libere, anche di vari recettori capsulati: nel connettivo periarticolare sono presenti i corpuscoli di Pacini (o lamellari), mentre nei legamenti i corpuscoli di Golgi (o "a bulbo"); questi recettori assicurano la propriocettività dei tessuti periarticolari e delle articolazioni (Barone, 2004).

In particolare nel gomito i nervi mediano ulnare e radiale passano vicino all'articolazione sotto la fascia dell'avambraccio. Il nervo mediale e il ramo associato dell'arteria brachiale attraversano l'articolazione sulla superficie

cranio-mediale sotto il muscolo pronatore rotondo. Il nervo ulnare e l'arteria ulnare collaterale attraversano in direzioni prossimale l'epicondilo mediale, quindi continuano distalmente tra la testa ulnare del flessore radiale del carpo e il flessore digitale superficiale sulla faccia cranio mediale della articolazione. Il nervo radiale si divide in un ramo superficiale e in un ramo profondo prossimali alla articolazione. Cranio lateralmente all'articolazione, il ramo radiale profondo decorre sotto l'estensore radiale del carpo; il ramo superficiale si divide e giace sotto i margini mediale e laterale della vena cefalica. Da questi grossi rami neurali si dipartono le terminazioni che si spingono in profondità sino a raggiungere la capsula articolare (Evans, De Lahunta, 2013).

## **IL GOMITO: UN ARTICOLAZIONE SINOVIALE**

L'articolazione sinoviale del gomito è un complesso mobile, facente parte del gruppo delle diartrosi, la cui prima funzione è quella di permettere il massimo grado di movimento. In un articolazione normale, il movimento traslatorio è minimo. Tale movimento è limitato dalla capsula articolare, dai legamenti, dal profilo osteocartilagineo, dai tendini periarticolari e dai muscoli. (Simon e Radin, 1997)

La seconda funzione in ordine di importanza della articolazione del gomito è quella di sostenere l'apparato muscolo-scheletrico e di distribuire il carico, che talvolta risulta essere estremamente alto. L'articolazione del gomito deve quindi distribuire e trasferire questi carichi mentre subisce gli stress da contatto attraverso la superficie articolare. Per esempio nel ginocchio umano, attraverso il corpo vengono trasmessi al suolo pesi superiori di 1 o 3 tre volte quello corporeo durante la deambulazione e 5-10 volte il peso corporeo durante la corsa. Una certa parte di questa energia associata al movimento è dissipata nelle ossa e nei muscoli, il rimanente viene trasmesso attraverso le superfici articolari. Allo stesso modo le superfici articolari del gomito hanno il compito di assorbire l'energia di carico dell'arto anteriore.

Tutte le articolazioni sinoviali sono caratterizzate dalla presenza di una cavità articolare, una capsula articolare, che comprende uno strato fibroso esterno ed una membrana sinoviale interna, un liquido sinoviale e delle cartilagini articolari, presenti sulle superfici articolari. I legamenti collaterali si sviluppano nello strato fibroso della capsula articolare. Alcune articolazioni, per svolgere la loro funzione nel migliore dei modi, hanno in più delle strutture specifiche come menischi, cuscinetti adiposi, legamenti intrarticolari, pliche e villi a protezione della membrana sinoviale, l'articolazione del gomito ne è sprovvista (Evans, De Lahunta, 2013; Barone, 2004).



## CARTILAGINE ARTICOLARE

---

La cartilagine dell'articolazione è di tipo ialino. Questa ha un aspetto traslucido ed è la forma di cartilagine meno differenziata, fisiologicamente costituisce il precursore dell'osso di sostituzione. Quando l'ossificazione è completata ne rimane uno strato sulle superfici articolari. Questo aspetto trasparente della cartilagine articolare è dovuto principalmente al suo alto contenuto in acqua (circa il 70% della cartilagine matura), e alla sua struttura ad elica di fibrille collagene. La sua composizione a secco è rappresentata per il 50% circa da collagene, per il 35% da proteoglicani, 10% da glicoproteine quali proteinasi, fattori della crescita, lisozima, fibronectina, condronectina e proteine della matrice cartilaginea, il 3% da minerali, l'1% da lipidi, e il restante 1-12 % da condrociti (Kent, 1997).

La cellularità della cartilagine è rappresentata quindi dai condrociti, che sono cellule immerse in una matrice extracellulare molto densa. Questo tessuto cartilagineo non ha né innervazione, né vascolarizzazione, né strutture linfatiche, per cui il passaggio di sostanze nutritive, alle cellule della cartilagine matura, avviene per diffusione dal liquido sinoviale attraverso la matrice extracellulare e la stessa via viene utilizzata anche per l'eliminazione dei cataboliti (Borghetti, Martini, 2002).

Le caratteristiche meccaniche uniche della cartilagine articolare dipendono dall'architettura del tessuto e dalle interazioni tra il condrocita e la matrice extracellulare. La maggior parte della cartilagine articolare è di tipo II, ma sono presenti anche piccole quantità del tipo VI, IX, XI, XII, XIV che costituiscono il 10-15% del totale (Buckwalter et al., 1998).

Il collagene di tipo II provvede a mantenere un'adeguata resistenza alla tensione, alla trazione e allo stiramento, e ha una struttura simile nel cane e nell'uomo (Todhunter et al., 1994). Il collagene di tipo II è codificato dal gene COL2A1, ma

lo splicing (mescolamento) dà origine a due trascritti di mRNA, per il pro collagene di tipo II A e IIB. Il tipo IIA è specifico per i tessuti condroprogenitori, il tipo IIB è espresso dai condrociti maturi (Sandell et al., 1994). Nuovamente il tipo IIA è espresso nella cartilagine osteoartritica, tanto che pazienti umani con alcune mutazioni nel gene del pro collagene di tipo II possono manifestare osteoartrite. Tra gli altri tipi di collagene ricordiamo il tipo IX il quale ha la funzione di stabilizzatore delle fibrille (Blaschke et al., 2000).

Il proteoglicano, l'altro maggiore componente solido della matrice cartilaginea articolare, è costituito da una o più catene di glucosaminoglicani (GAG) attaccate ad un core proteico, che interagiscono con le fibrille del collagene di tipo I e II. Le catene di glicosaminoglicano condroitin solfato, dermatan solfato o cheratan solfato, sono covalentemente legate alla proteina del core. Topi di laboratorio a cui non è stato fatto esprimere il gene codificante per queste catene di glicosaminoglicani, hanno mostrato un fenotipo letale (Aszodi et al., 2000). Un'altra componente della matrice extracellulare è costituita dalle glicoproteine non proteoglicane quali: fibronectine, trombospondine e proteina oligomerica della matrice. Queste costituiscono una piccola ma importante porzione della cartilagine articolare (Tester et al., 1999).

La cartilagine articolare viene microscopicamente suddivisa in base alla disposizione dei condrociti e all'organizzazione del collagene e dei proteoglicani, in quattro zone principali:

- la lamina obscurans o strato superficiale (zona I);
- lo strato transizionale o intermedio (zona II);
- lo strato radiale o profondo (zona III);
- lo strato calcificato (zona IV).

Nello specifico la cartilagine articolare può essere suddivisa in tre zone non mineralizzate (zona da I a III) che sono delimitate dalla zona calcificata (zona IV) mediante una linea di demarcazione. Il confine inferiore della cartilagine calcificata matura è la linea di cemento che si forma al termine della ossificazione endocondrale della zona di accrescimento articolare-epifisale al momento della maturità. Negli animali adulti la zona I ha la più alta densità cellulare. I condrociti sono relativamente più piccoli e appiattiti e orientati con l'asse lungo parallelo alla superficie. La zona II, o zona di transizione, mostra profili cellulari più grandi e arrotondati. Nella zona III o zona radiata, le cellule sono più grandi e disposte con il loro asse maggiore perpendicolare alla superficie.

I condrociti sulla superficie della cartilagine hanno un aspetto fibroblastico, simili a cellule connettivali. Le cellule negli strati più profondi sono invece più gonfie con organuli cellulari ben rappresentati (Schenk et al, 1986). L'organizzazione cellulare della cartilagine articolare è complementare alla organizzazione delle fibrille collagene. L'organizzazione geometrica e l'allineamento di queste fibrille variano a seconda della sede anatomica e della profondità del tessuto. Superficialmente le fibrille sono tangenziali alla superficie articolare, nella zona media vanno a formare una sorta di rete tridimensionale mentre nelle zone profonde e calcificate le fibrille sono più grandi e prevalentemente perpendicolari alla superficie tali da formare una maglia più rigida che può essere riempita di cristalli di idrossiapatite propri della cartilagine calcificata. Le differenze strutturali tra i diversi strati non sono chiaramente definite, certo è che lo strato superficiale forma una barriera di rivestimento protettivo resistente al logorio e agli insulti caratteristici della superficie articolare. Le fibrille invece della zona più profonde sono organizzate per fornire una notevole resistenza alla trazione, allo stiramento e sono dotate di una notevole elasticità (Setton et al, 1999). La concentrazione di proteoglicano aumenta con l'aumento della profondità e quindi le fibrille di collagene sono più concentrate alla superficie. L'aumentata concentrazione di proteoglicani in profondità conferisce una maggior resistenza alla compressione.

## **LA CELLULARITA' DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE : IL CONDROCITA**

I condrociti rappresentano solamente 1-12% della cartilagine articolare ma sono i responsabili della produzione e del mantenimento della stessa. Essi producono e regolano una matrice organizzata lontana dai vasi sanguigni, dai nervi, e dai linfatici, che sono esclusi dall'ambiente articolare.

Il metabolismo della cartilagine è prevalentemente anaerobio. Sebbene il consumo di ossigeno sia basso ovvero rappresenta circa il 2% dei tessuti vascolarizzati, l'utilizzo dell'ossigeno fornisce ancora una frazione sostanziale dei fabbisogni energetici della cellula. I nutrienti, comprendenti il glucosio, l'ossigeno e gli aminoacidi, si diffondono dal liquido sinoviale. La diffusione dipende dalla dimensione, dalla forma, e dalla carica molecolare, oltre che dalla concentrazione di proteoglicani nella cartilagine (Hegemann et al, 2002). In generale le molecole più grandi dell'emoglobina, sono escluse dalla diffusione nella matrice cartilaginea. L'azione di pompa intermittente del sostenimento del peso, probabilmente aiuta la diffusione. Tra le componenti principali della matrice ricordiamo certamente il tropocollagene che deriva dalla molecola del procollagene. Il tropocollagene si forma quindi nello spazio extracellulare e viene assemblato successivamente in fibrille, che si legano in maniera crociata nella matrice extracellulare non appena il tessuto matura.

Il glucosamino glicano è un altro importante componente della matrice e riconosce l'apparato del Golgi come maggiore organulo implicato nella sua formazione. Questo successivamente andrà a costituire la matrice cellulare amorfa (Morales e Hascall, 1998).

I condrociti hanno un ruolo fondamentale nel ricambio della matrice cartilaginea stessa. Attorno ai condrociti prende spazio la "matrice pericellulare" o "capsula" che è uno strato privo di collagene ma ricco di peptidoglicani, esternamente a questa si sviluppa la "matrice territoriale" caratterizzata da una fitta rete di fibre

collagene sottili e da una sostanza fondamentale che è a sua volta circondata dalla “matrice interterritoriale” contenente grosse fibre collagene e grosse quantità di proteoglicani. La funzione dei condrociti è quella di sintetizzare, organizzare e regolare la composizione della complessa matrice pericellulare.

Ad ogni stadio di crescita, di sviluppo e maturazione del condrocita corrisponde una sempre equilibrata sintesi e degradazione della matrice extracellulare. Alcuni autori hanno ipotizzato il tempo di turnover del collagene, stimandolo di ben 120 anni per il cane e 350 per l'uomo.

La struttura imputata per questo lento tempo di turnover è la fibrilla, che stringendo legami crociati covalenti, non permette una facile aggressione enzimatica. Le metalloproteinasi (collagenasi) 1, 8 e 13 della matrice sono gli unici enzimi conosciuti in grado di scindere le molecole fibrillari. Autori hanno iniettato un enzima gastrico in articolazione, inducendo una degradazione e successiva riparazione con proteoglicano che può essere sostituito. Un danno alla matrice cartilaginea superiore del 50% del proteoglicano presente causa una degenerazione articolare irreversibile. (Hunziker et al, 2002; Chen et al, 1993).

È indiscusso che il turnover della matrice extracellulare sia in condizioni normali che patologiche, è influenzato dall'ambiente meccanico, dalle citochine e dai fattori di crescita. Ognuno di questi fattori, eccetto quello meccanico, è prodotto dalle cellule della membrana sinoviale e dai condrociti. Il carico meccanico e le citochine influenzano l'attivazione degli enzimi condrocitici, che possono degradare la matrice cartilaginea, mentre questo processo di degradazione viene controbilanciato da un inibitori enzimatici e dalla sintesi del fattore di crescita (Hilal et al, 2001).

L'osteoartrite è classicamente più presente nei pazienti anziani, sia umani che di altre specie come il cane. È importante sottolineare che alterazioni che si verificano nei proteoglicani di un paziente anziano non sono le stesse che si verificano in un paziente con cartilagine artrosica. La cartilagine di un paziente

anziano umano presenta una percentuale maggiore di cheratan solfato e condroitin 6-solfato rispetto al condroitin 4-solfato della cartilagine dei pazienti giovani (Pratta et al, 2000) . Il fatto può essere spiegato supponendo un aumentata sensibilità dell'aggrecano per la metalloproteinasi 13 della matrice extracellulare. Le sub unità di aggrecano sono più grandi che nell'adulto e nell'anziano, e questo potrebbe essere un altro motivo per l'aumentata sensibilità di clivaggio, da parte della metalloproteinasi. Un diverso metabolismo cellulare dovuto all'età viene anche accompagnato da una minore risposta dei condrociti nei confronti delle citochine come interleuchina 1 (Tetlow et al, 2001; Messai et al, 2000; Massicotte et al, 2002).

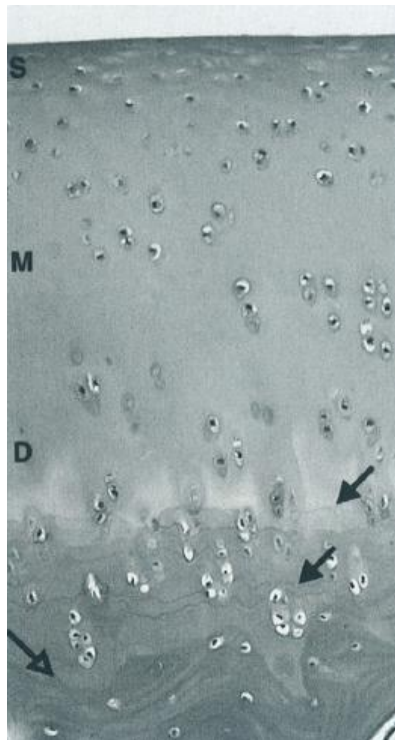


FIG. 1: CARTILAGINE ARTICOLARE: S) LAMINA OBSCURANS O STRATO SUPERFICIALE; M) ZONA INTERMEDIA; D) STRATO RADIALE O PROFONDO; TIDEMARKS (FRECCHE PIENE); GIUNZIONE TRA CARTILAGINE ARTICOLARE E OSSO SUB CONDRALE (FRECCIA VUOTA) (EURELL,VAN SIKLE 2000).

## IL CONTENITORE DELL'ARTICOLAZIONE: LA CAPSULA SINOVIALE

---

La capsula articolare forma un manicotto attorno ai capi articolari e nei punti di maggior sollecitazione meccanica è rinforzata da fasci fibrosi (Borghetti, Martini, 2002).

E' composta da una membrana fibrosa esterna e una membrana sinoviale interna (Evans, De Lahunta, 2013).

Alcuni autori considerano la membrana sinoviale e la parte fibrosa come due strati separati che compongono insieme la capsula articolare, altri autori invece li considerano come due organi distinti (Barone, 2004).

La capsula articolare consiste ad ogni modo in una spessa porzione fibrosa rivestita da una sottile sotto sinovia o lamina propria e dalla sinovia o membrana sinoviale in contatto con il liquido sinoviale. In una articolazione sana, una piccola quantità di liquido sinoviale, di colore giallo paglierino e vischioso, occupa lo spazio intrarticolare. I vasi sanguigni maggiori che ramificano nella capsula articolare fibrosa e nella sottosinovia vascolarizzano anche i legamenti articolari. I vasi sanguigni sono accompagnati dai linfatici e dai nervi (Todhunter, 2005).

Nello specifico la capsula fibrosa è un manicotto fibroso che avvolge completamente l'articolazione e ricopre la membrana sinoviale. Può prendere attacco sia sul margine articolare sia ad una certa distanza da questo.

Il suo spessore può variare molto, in alcuni casi è molto spessa e costituisce un vero e proprio legamento capsulare, in altri è molto sottile e può perfino mancare, formando degli orifizi in cui possono passare recessi della membrana sinoviale (Barone, 2004).

I legamenti collaterali spesso sono ispessimenti della porzione fibrosa della capsula articolare.

La capsula fibrosa è composta principalmente da tessuto fibroso che è ricco di fasci composti da numerose fibre collagene che hanno orientamenti diversi, i fasci superficiali sono longitudinali mentre quelli più profondi sono obliqui e trasversali, lo stesso tessuto fibroso è invece povero di matrice amorfa che contiene poche cellule e poche fibre elastiche. Queste ultime, gialle ed elastiche possono essere più o meno abbondanti a seconda della zona. Tutti questi fasci vengono poi uniti da un tessuto connettivale lasso, molto simile a quello dei legamenti (Borghetti,Martini, 2002).

La superficie esterna della capsula in alcuni casi riceve l' attacco di fibre tendinee in altri casi può invece fondersi con fasce e lamine,in generale compartecipa solo con alcune fibre connettivali e con i tendini inseriti in vicinanza (Barone, 2004).

La capsula fibrosa si connette alle ossa mediante delle fibre collagene che vanno ad inserirsi sul periostio o penetrano calcificando direttamente nell'osso (Borghetti,Martini 2002).

## **I CONTENUTI: LIQUIDO E MEMBRANA SINOVIALE**

La membrana sinoviale è un tessuto connettivo responsabile del turn-over del fluido sinoviale, riveste la faccia profonda della capsula fibrosa con la quale è unita mediante un sottile strato connettivale, ricopre inoltre l'interno delle articolazioni sinoviali ad eccezione delle cartilagini articolari e i menischi, che lascia liberi. La sinovia viene considerata come un mesenchima modificato, di cui l'intima ricopre uno strato di tessuto connettivo e può essere fibrosa, areolareo adiposa(Barone,2004; Evans,De Lahunta,2013).

La membrana sinoviale,nelle parti in cui la capsula fibrosa è molto sottile, può uscire e formare dei recessi chiamati fondi ciechi sinoviali all'interno dei quali può accumularsi liquido sinoviale durante i vari movimenti. Queste strutture



possono favorire lo scorrimento dei tendini sull'articolazione e in solchi ossei vicini (Barone, 2004).

La faccia interna della membrana sinoviale è leggermente irregolare, viene sollevata in alcuni punti da dei sottostanti accumuli adiposi che, a seconda del movimento effettuato dalle superfici articolari, vengono aspirati o respinti insieme ad essa. Altre strutture simili ma molto più piccole sono le pliche sinoviali (Evans, De Lahunta, 2013).

I villi sinoviali invece sono dei rilievi filiformi, di solito molto corti, che si trovano sulla faccia intra-articolare della membrana e sono costituiti da tessuto connettivo vascolarizzato rivestito da uno strato di cellule sinoviali. Sia le pliche che i villi servono per aumentare la superficie di scambio tra sinoviale e sinovia (Barone, 2004).

La membrana sinoviale è composta da due strati: uno più esterno vascolarizzato chiamato lamina propria, e uno più interno, la lamina intima, privo di vascolarizzazione.

La lamina propria, sottile e fibrosa nei settori sottoposti a grandi sollecitazioni, diventa invece più spessa e lassa dove le fibre collagene si mescolano con le numerose fibre elastiche, questo strato funge da supporto per i villi e le pieghe sinoviali, presenta inoltre vari tipi di cellule: fibrociti, mastociti (soprattutto nelle parti più ispessite) e abbondanti adipociti nelle pliche, spesso raggruppati in lobuli adiposi (MacWilliams et al, 2003).

La vascolarizzazione è data da fitte reti capillari, soprattutto nelle zone meno fibrose, che si mescolano con i vasi linfatici responsabili degli scambi di fluidi con la cavità (Barone, 2004).

Lo strato più interno, come scritto sopra, non presenta rete vascolare e si distingue in due tipi principali: nelle parti di articolazione soggette a forti tensioni e scorrimenti lo strato è quasi del tutto fibroso con rare cellule mentre, dove l'

attività meccanica è debole, per esempio sui villi, sulle pliche e sui cercini presenta due o tre strati di cellule, chiamate sinoviti che a loro volta si distinguono in cellule di tipo B secretorie e cellule di tipo A fagocitarie, facenti parte del sistema reticolo-istiocitario. Sono inoltre presenti anche cellule con caratteristiche intermedie e cellule non secernenti di tipo indifferenziato .

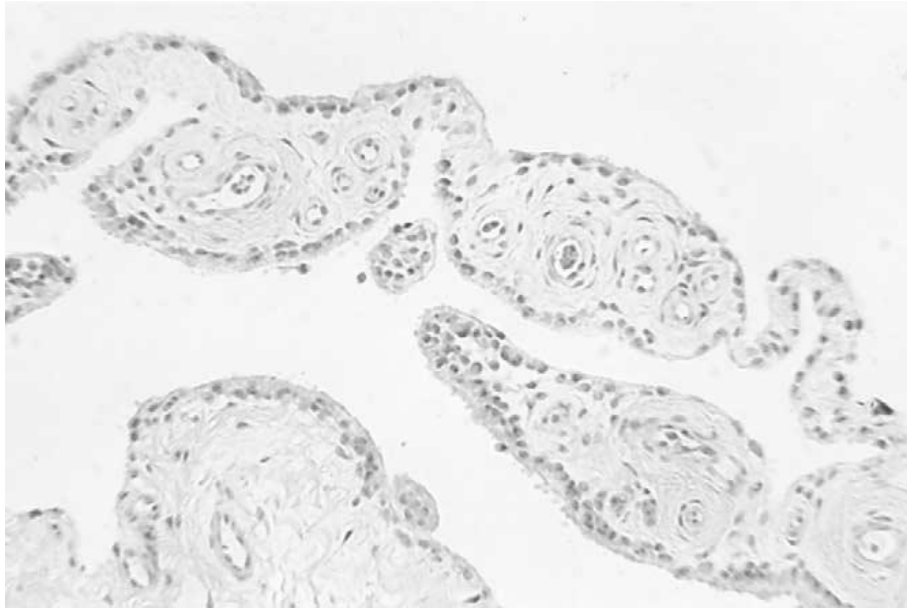


FIG. 2: SEZIONE ISTOLOGICA DI MEMBRANA SINOVIALE NORMALE; SONO EVIDENTI I VASI SANGUGNI E LA CELLULARITA' TIPICA IMMERSE NEL TESSUTO CONNETTIVO (MECWILLIAMS ET ALL, 2003) .

Le funzioni della membrana sinoviale sono la produzione di acido ialuronico (cellule B), la fagocitosi (cellule A), la regolazione del contenuto salino e proteico del liquido sinoviale (mediante l'equilibrio tra diffusione intrasinoviale dei componenti plasmatici e il riassorbimento linfatico), l'attività di rigenerazione e di proliferazione dei sinoviociti e le proprietà meccaniche di contrazione e distensione in base al movimento dell'articolazione (Borghetti,Martini,2002).

Il maggiore collagene delle fibre sub-intimali è il collagene di tipo IV , accompagnato da più piccola quantità di collagene di tipo I, III e V. Nell'intima e

nella sub-intima sono presenti anche i glicosamino glicani solfati (condroitin 4-solfato e 6-solfato) e le glicoproteine strutturali come la fibronectina, la laminina, l'entactina e la tenascina (Garnero et al., 2000).

L'intima è uno strato incompleto, il cui spessore è costituito da quattro sinoviociti, senza membrana basale. I sinoviociti sono caratterizzati da insiemi di cellule che hanno, come accennato in precedenza, funzioni sia secretorie (tipo B) che fagocitarie (tipo A). In particolare le cellule sinoviali tipo B di rivestimento sintetizzano l'ialuronano che viene secreto nel liquido sinoviale a livello della membrana plasmatica così come gli altri componenti della matrice extracellulare della sinovia. La lubricina è una glicoproteina di superficie, ricca di treonina di prolina che comprende il 40% dei carboidrati secreti dalle cellule sinoviali di rivestimento. La lubricina è coinvolta nella lubrificazione periferica della cartilagine in associazione ai fosfolipidi di superficie attivi ed è sintetizzata anche dalla sinovia. I vasi sanguigni si estendono fino ad una profondità di 5-10µm della superficie intima (Hills, 2000).

Il liquido sinoviale è un liquido vischioso e incolore, a volte leggermente giallo, i suoi caratteri possono comunque variare a seconda di diversi fattori, come età, specie e condizioni fisiologiche (Barone, 2004). Tale liquido serve per lubrificare la superficie articolare delle articolazioni sinoviali, per trasportare materiale nutritivo alla cartilagine ialina e per rimuovere da questa i cataboliti prodotti; il suo volume è generalmente scarso, nell'articolazione del ginocchio del cane la quantità di liquido varia dai 0,2 ml ai 2 ml. La quantità media di liquido sinoviale che si riscontra in un'articolazione normale di gomito è di circa 0,5 millilitri. (Evans, De Lahunta, 2013). Anche la composizione chimica è molto variabile, ci sono variazioni dovute all'età del soggetto, all'articolazione presa in esame e allo stato di salute articolare; la sinovia di un animale attivo ha una percentuale di sostanza secca doppia di quella di un animale sedentario, ma contiene meno sali minerali (Barone, 2004).



FIG. 3: VISCOSITA' NORMALE DEL LIQUIDO SINOVIALE, CHE DEVE ESSERE COMPRESA TRA I 2,5 ED I 5 CM CIRCA. (MACWILLIAMS ET ALL, 2003).

Il liquido sinoviale, contenuto nella cavità articolare delle diartrosi, viene prodotto dalla membrana sinoviale ed è un ultrafiltrato del plasma. La maggior parte dei suoi ioni e delle sue molecole sono presenti nel plasma ad eccezione dell'alta concentrazione di ialuronano nel liquido sinoviale. Generalmente le proteine ad alto peso sono escluse dallo spazio intrasinoviale. Il liquido sinoviale contiene inoltre cellule di rivestimento sinoviale, monociti e linfociti che rappresentano il 90% del totale. Il resto delle cellule è costituito da leucociti polimorfo nucleati (MacWilliams et al, 2003).

L'intima è la barriera ultima tra il liquido sinoviale e il fluido intravascolare. L'assenza di una membrana basale propria della membrana intima e la prossimità dei capillari alla superficie intima facilita lo scambio dei soluti. Lo scambio tra plasma e liquido sinoviale è governato dalla pressione osmotica e idrostatica, che differisce tra plasma e liquido sinoviale. A livello degli angoli articolari intermedi, un bilancio netto della pressione favorisce l'ultrafiltrazione del plasma nell' articolazione. Le grandi molecole non sono in grado di oltrepassare l'endotelio dei capillari sinoviali. La barriera sinoviale nei confronti delle piccole molecole è mantenuta dal contatto tra i sinoviociti e la

composizione della matrice extracellulare. Anche lo ialuronano funziona da barriera per lo scambio di piccole molecole.

Le sostanze a basso peso molecolare di solito mantengono l'equilibrio tra plasma e liquido sinoviale per mezzo di una diffusione semplice. Il glucosio invece, penetra nell'articolazione per mezzo di una diffusione facilitata. Le molecole lipofile, come l'ossigeno e l'anidride carbonica, si diffondono liberamente dentro e fuori il liquido sinoviale. Tra le funzioni più importanti del liquido sinoviale si annovera quella di trofismo per la cartilagine articolare e i legamenti intra-articolari (Venn et al, 2002) .

La pressione intrasinoviale normale è sub-atmosferica e favorisce la stabilizzazione dell'articolazione. I fattori che influenzano la pressione intrarticolare normale comprendono la dimensione dell'articolazione, il volume del liquido sinoviale, la posizione rispetto all'estensione e alla flessione, il tessuto periarticolare, la permeabilità della membrana e la compliance capsulare per il movimento del liquido dentro fuori l'articolazione. Su queste basi il principio del test per l'evozione del dolore è di distendere l'innervazione del tessuto molle craniale già sensibilizzata dalla patologia articolare, comprimere l'innervazione caudale e ridurre il volume intra articolare disponibile, in modo che il liquido sinoviale sia forzato contro la capsula (Piermattei et al, 2004).

Lo ialuronano è una molecola formata da una catena polisaccaridica di N-acetilglucosamina e acido glicuronico il cui peso molecolare medio è un migliaio di kDa. La sintesi dello ialuronano a livello delle cellule fibroblasti della membrana sinoviale è catalizzata dall'enzima ialurano sintasi, mentre lo ialuronano viene secreto nello spazio extracellulare durante l'allungamento. In soluzione, lo ialuronano adotta una configurazione con alta affinità per l'acqua. Lo ialuronano viene avvolto da molecole immunoglobuliniche, che aggrovigliandosi saldamente forniscono un'alta viscosità al liquido sinoviale. La natura viscosa del liquido sinoviale permette di sostenere le forze di slittamento

transitorie (che si verificano durante il movimento) e di assorbire una certa parte di energia generata dal moto dell'articolazione. Va però ricordato che alle alte velocità di slittamento, per esempio durante il lavoro, il liquido sinoviale diventa meno viscoso. Questa proprietà tipica dei gel viene chiamata tixotropia, cioè la proprietà per la quale il gel riduce la propria viscosità quando viene agitato o scosso, e la riaquista con il riposo. Inoltre lo ialuronano nella matrice intrarticolare può comportarsi come un filtro molecolare: più lo ialuronano è concentrato nella matrice e più ne inibisce la sua diffusione. Il liquido può lasciare l'articolazione mediante due vie: o tramite lo spazio interstiziale o tramite il letto capillare. In vitro la proliferazione di cellule sinoviali risulta inibita dalla normale concentrazione di ialuronano presente nel liquido sinoviale. Se iniettato in articolazione lo ialuronano fuoriesce in 1-2 giorni (Necas et al, 2008).

In definitiva si può affermare che il liquido sinoviale è un distillato del plasma, contiene infatti acqua e sali liberamente ultra filtrati, è ricco di acido ialuronico, enzimi lisosomiali, glicoproteine, con poche cellule e proteine ed è totalmente privo di fibrinogeno in condizioni fisiologiche (Borghetti, Martini, 2002; Laurent et al, 1992).

Come ricordato una delle sue funzioni principali è quella di lubrificare l'articolazione. Il liquido sinoviale prodotto dalla membrana sinoviale, si ipotizza che venga trasudato dalla cartilagine durante la compressione e che tra le due opposte superfici si formi uno strato di liquido. Il liquido viene quindi concentrato sulla superficie cartilaginea la quale diminuisce il coefficiente di attrito. La lubrificina ed il suo fosfolipide associato fornirebbero di conseguenza una lubrificazione marginale della cartilagine articolare.

E' importante ricordare che anche una adeguata lubrificazione periferica della membrana sinoviale è importante per diminuire la resistenza associata al movimento articolare. La capsula articolare e i tendini circostanti forniscono la resistenza maggiore al movimento articolare poiché l'energia spesa per

distendere i tessuti molli è quasi cento volte maggiore di quella richiesta per vincere la resistenza di attrito superficiale (Schmidt et al, 2007).

## IL SOSTEGNO: L'OSSO SUBCONDRALE

---

Il tessuto sottostante la cartilagine articolare prende il nome di osso subcondrale, ed esso contiene fattori di crescita e citochine che sono presenti anche nella cartilagine articolare. Questi peptidi comprendono i fattori di crescita trasformanti beta, i fattori di crescita insulino-simili, il fattore di crescita derivato dalle piastrine ed i fattori della crescita del fibroblasto. L'osso contiene anche le citochine pro-infiammatorie, le interleuchine, il fattore di necrosi tumorale alfa e l'interferone gamma. Le metalloproteine della matrice vengono secrete dagli osteoblasti specialmente dopo stimolazione da parte delle citochine come l'interleuchina 1 (IL-1) (Imhof et al, 1999; Malinin et al, 2000) .

Generalmente la rigidità dell'osso è in grado di comportare grandi carichi senza subire deformazioni, e una delle sue caratteristiche fondamentali è quella di fornire un supporto strutturale alla cartilagine articolare che lo riveste. L'osso subcondrale possiede anche delle capacità elastiche tali da distribuire un carico assiale in modo omogeneo sulla superficie articolare (Li et al, 2005 ).

## DINAMISMO DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE

---

Alla nascita la cartilagine è biochimicamente uniforme ma a 5 mesi di età, in uno studio effettuato su puledri, era già evidente una eterogeneità. E' stato notato che immobilizzando le articolazioni con gessi e fissatori esterni si osservavano alterazioni cartilaginee tipiche dell'osteoartrosi quali: spazio articolare ravvicinato, osteofitosi, sclerosi subcondrale, fibrillazione, ulcerazione ed ispessimento capsulare e ridotto contenuto di proteoglicani cartilaginei. Lo

stesso accade se alla cartilagine articolare vengono sottratte le forze vettoriali di carico (Brama et al, 2000). Molti test sono stati effettuati in vivo, ma sempre è risultato molto difficoltoso studiare gli effetti del carico e dell'esercizio direttamente sulla cartilagine. Test in vitro hanno evidenziato che un carico statico generalmente inibisce l'attività di biosintesi. Un carico dinamico invece ha un effetto più complesso, dipendendo dalla direzione, dalla intensità, dalla frequenza, dal ciclo di lavoro e dal tempo in coltura (Sah et al, 1989; Farquhar et al, 1994). Semplificando si può affermare che un modesto carico ciclico aumenta la sintesi di proteoglicano e delle proteine in genere. Al contrario periodi più prolungati e carichi pesanti producono una drammatica inibizione del proteoglicano e della sintesi proteica. Anche l'osso subcondrale risponde a cicli di carico modellando-rimodellando la sua trabecolatura. Ad uno stress elevato gli osteoblasti rispondono con un'aumentata sintesi di prostaglandina  $E_2$  seguita da una proliferazione cellulare. Al contrario ad un basso stress ciclico viene inibita la proliferazione cellulare e aumentata la sintesi di proteine, esitando in un aumentato deposito di matrice. Il riassorbimento osteoclastico nelle ossa lunghe cartilaginee viene inibito dalle forze compressive intermittenti (Burger e Veldhuijzen, 1993).



## **LA MALATTIA DELL'ARTICOLAZIONE: L'OSTEOARTRITE**

L'osteoartrite (OA) o malattia degenerativa articolare (DJD), è una degenerazione cartilaginea lenta e progressiva, con produzione di osteofiti. L'OA colpisce circa il 20% dei cani degli Stati Uniti, ed è una delle più frequenti cause di eutanasia (Innes et al, 2000)

Clinicamente l'OA è caratterizzata da dolore articolare, limitazione del movimento, versamento articolare e gradi variabili di infiammazione locale. In caso di OA la capsula articolare e la membrana sinoviale mostrano i cambiamenti strutturali caratteristici dell'infiammazione cronica, come l'iperplasia dei sinoviociti, l'infiltrazione di cellule infiammatorie nel tessuto connettivo e la fibrosi (Goldenberg et al, 1982).

Dal punto di vista biochimico essa è caratterizzata dalla riduzione della concentrazione del proteoglicano nella cartilagine, un aumento nel contenuto d'acqua, un aumentata disgregazione della fibrilla collagene ed uno squilibrio nel turnover delle molecole che costituiscono la matrice cartilaginea. Macroscopicamente la malattia si esprime come una perdita di cartilagine articolare più frequentemente nelle aree sottoposte a maggior carico, sclerosi dell'osso subcondrale, osteofiti ed entesiofiti e gradi variabili di infiammazione articolare. Istologicamente invece è di frequente riscontro una diminuita captazione dei coloranti, una fibrillazione superficiale seguita successivamente da fessurazioni verticali, e tentativi di riparazione e rimodellamento. In stadi avanzati si assiste alla totale perdita della cartilagine sino a raggiungere sclerosi e osteonecrosi locale.

Biomeccanicamente l'OA è caratterizzata da un'alterazione delle proprietà elastiche tensili compressive e di permeabilità della cartilagine articolare. Questi cambiamenti superficiali corrispondono ad una aumentata rigidità dell'osso subcondrale (Pelletier et al. 2001)

Il contributo della membrana sinoviale alla progressione della OA rimane controverso poiché una infiammazione è chiaramente coinvolta nella patogenesi (Pelletier et al, 1999; Smith, 1999). Il coinvolgimento del tessuto sinoviale nella patogenesi dell'OA avviene generalmente per traumi che causano un'eccessiva liberazione di costituenti fondamentali della matrice cartilaginea o per il distacco di frammenti dalla cartilagine danneggiata, questi eventi attivano i macrofagi sinoviali e i fibroblasti producendo una grande quantità di fattori catabolici che amplificano la degenerazione dei tessuti. L'infiammazione della sinovia segue il rilascio nella cavità articolare di frammenti cartilaginei, di frazioni di membrane condrocitarie, di microcristalli, di eicosanoidi e di citochine che alterano l'ambiente intrarticolare (Nalbant et al, 2003).

Nella displasia del gomito del cane per esempio, dove le sollecitazioni meccaniche errate inducono a sinovite quest'ultima accompagna spesso l'osteoartrite e il dolore origina in parte dalla sinovia infiammata. La sinovite è caratterizzata da una infiltrazione di cellule infiammatorie, da una proliferazione vascolare, da una iperplasia ipertrofia delle cellule di rivestimento e da un aumentato numero di cellule nel liquido sinoviale (Freeman et al, 1991). La sinovite secondaria è invece dovuta ad un trauma della cartilagine articolare o all'osso subcondrale. E' possibile identificare dei cambiamenti istologici della membrana sinoviale sia in modelli in vitro che in campioni bioptici o su modelli sperimentalmente indotti (Spadari et al, 2013).

Il dolore che deriva da una stimolazione sia meccanica che chimica, è mediato dalle prostaglandine. I neutrofili ed i macrofagi sono attratti nelle articolazioni infiammate da agenti chemio tattici come i leucotrieni e i prodotti di degradazione articolare. La sinovia di articolazioni osteoartrosiche mostra elevate quantità di metalloproteinasi 3. Inoltre i mediatori liberati dalla sinovia infiammata sono implicati nell'induzione della degradazione della matrice cartilaginea in ginocchia di cane instabili sperimentalmente indotte. Va sottolineato però che nell'OA è il condrocita la fonte maggiore dell'attività di degradazione (Salinardi et al, 2006; Smith, 1999). La sinovite può inoltre

alterare la qualità e la quantità di ialuronano. La depolimerizzazione dello ialuronano è la base per ridurre la viscosità del liquido sinoviale. I radicali liberi dell'ossigeno e gli enzimi dei sinoviociti determinano la degradazione dello ialuronano nel liquido e nell'interstizio dell'articolazione. Questo si riflette in una diminuita viscosità del liquido sinoviale. Ne segue che un liquido sinoviale anormale si comporta sotto una tensione media come un liquido sinoviale normale sotto una tensione intensa (MacWilliam et al, 2003). In definitiva poiché il liquido sinoviale in molti casi di OA assume caratteristiche patologiche date da un numero più elevato di cellule mononucleate (macrofagi e linfociti T) e da una concentrazione maggiore d'immunoglobuline, citochine antiinfiammatorie e fattori catabolici (*Krenn et al, 1999; Nakamura et al, 1999*). Siccome il liquido sinoviale occupa la tutta la cavità articolare e pervade completamente lo strato cartilagineo arrivando a lambire l'osso subcondrale, se contiene fattori catabolici in eccesso, altera l'intero ambiente, così il catabolismo dei tessuti avanza di pari passo con l'osteoartrosi arrivando a coinvolgere tutte le strutture dell'articolazione sinoviale: la capsula sinoviale, la cartilagine e l'osso subcondrale; il risultato finale consiste nella perdita del tessuto cartilagineo e nel danneggiamento generale dell'articolazione.

Le citochine e i fattori di crescita giocano un ruolo fondamentale nell'induzione e nella progressione della OA. L'interleuchina 1 e il fattore alfa di necrosi tumorale inducono una deplezione della matrice cartilaginea aumentando la sintesi delle metalloproteinasi e diminuendo la sintesi delle proteine della matrice. Le principali citochine pro infiammatorie, antiinfiammatorie e antagoniste coinvolte nella fisiopatologia dell'OA, comprendono le interleuchine, il fattore inibitore per la leucemia, il fattore alfa di necrosi tumorale e il recettore antagonista interleuchina 1. Nella membrana sinoviale del cane sono state identificate due mediatori simili ma geneticamente distinti all'interleuchina 1 alfa. L'interleuchina 1 induce una aumentata attività della metalloproteinasi presente nella matrice e una diminuita sintesi del proteoglicano e del collagene di tipo 2 e una aumentata produzione della prostaglandina e 2. L'effetto dell'interleuchina 1

sembra richiedere la presenza di ossido nitrico per indurre la diminuita sintesi di proteoglicano (Carter et al, 1999). Alcuni autori affermano invece che il suo ruolo non sembra così critico come si pensava perché sono emerse nuove e diverse ipotesi sull'origine del catabolismo cartilagineo in corso di OA, ad esempio si pensa che l'IL-1 necessiti di altri fattori per esprimere la sua attività catabolica. In un'OA canina sperimentalmente indotta con la resezione del legamento crociato craniale sono stati trovati livelli dell'IL-6 e del TNF $\alpha$  più elevati del normale (Milner et al, 2001).

A complicare ulteriormente la catena degli eventi scatenanti l'OA è arrivata la dimostrazione che lo sfaldamento proteolitico della cartilagine può essere causato anche dai danni ossidativi sostenuti dai specie reattive dell'ossigeno (ROS) liberati dai condrociti e dalle cellule del panno sinoviale che ricoprono i margini della cartilagine. Nella fase conclamata dell'OA i condrociti, a causa di un metabolismo rallentato e sbilanciato a favore dei processi catabolici, producono alti livelli di metalloproteinasi e bassi livelli di matrice cartilaginea. Lo sbilanciamento tra attività cataboliche e anaboliche è responsabile della progressiva degradazione della matrice (Bluteau et al., 2001; Tetlow et al, 2001). Le frazioni di membrana dei condrociti, oltre ad innescare l'infiammazione della sinovia, scatenano reazioni autoimmuni nei confronti della cartilagine, sia di tipo umorale, sia di tipo cellulare, il risultato è la precoce distruzione della cartilagine con rilascio di molti auto antigeni, che sostenendo processi infiammatori cronici intensificano la distruzione delle strutture articolari perpetuandola (Alsalameh et al, 1990; Guerassimov et al, 1999; Sakkas and Plat-soucas, 2002).

Va chiarito che oltre alla cartilagine affetta da OA anche una membrana sinoviale infiammata presenta un'attività maggiore della metalloproteinasi (Salinardi et al, 2006b). Il fattore di necrosi tumorale prevede due isoforme attive: esse up-regolano l'interleuchina 1 e 6 relativamente alla diminuita sintesi di proteoglicano e ad una diminuita espressione del collagene di tipo 1. In

particolare nell'OA il fattore di necrosi tumorale contribuisce alla perdita focale di cartilagine (Westacott et al, 2000).

La famiglia delle metalloproteinasi di matrice è un gruppo di endopeptidasi zinco dipendenti, che quando attivate, degradano la matrice extracellulare (Ravanti e Kahari, 2000).

Nel cane l'inibitore tissutale della metalloproteinasi 2 è individuato nei fibroblasti sinoviali.

Altro fattore implicato nella patogenesi della OA è il fattore di crescita 1 insulino simile. La sua azione si esplica come una up regolazione del proteoglicano solforato e con una inibizione della degradazione del proteoglicano stesso. Il fattore di crescita insulino simile, sintetizzato dai condrociti, contrasta gli effetti degradanti e inibenti della interleuchina 1 e del fattore di necrosi tumorale beta e dell'acido retinoico sulla cartilagine articolare (Van Susante et al, 2000).

Le complesse cascate di causa effetto che caratterizzano l'OA hanno portato alla suddivisione di quest'ultima in due fasi: una iniziale (o fase precoce) ed una tardiva.

La fase precoce è caratterizzata da una risposta ipertrofica del condrocita e da una aumentata espressione del condroitin solfato anormale. Allo stesso tempo la sinovite induce un aumento dell'espressione del pro collagene di tipo II, ed un aumento in modo inferiore di aggregano. Altro marker specifico di OA nella sua fase precoce è l'aumentata sintesi di fibronectina da parte dei condrociti. I frammenti liberi di fibronectina non hanno ancora un chiaro ruolo nella patogenesi dell'OA, ma sono stati sempre ritrovati nel liquido sinoviale artrosico degli studi "in vivo". (Hegemann et al, 2002). Le fasi iniziali dell'OA si caratterizzano inoltre da un aumento di proteoglicano, il quale diminuisce bruscamente con la progressione della patologia. La cartilagine articolare normale richiede il mantenimento della coordinata sintesi e degradazione delle componenti della matrice cartilaginea. Se questo mantenimento dell'equilibrio viene interrotto si esita ad una degradazione della matrice superiore al tentativo

da parte del condrocita di ripristinare il danno di matrice. Questo punto rappresenta una criticità nella complessa cascata dell'OA (Hegemann et al, 2002).

Alla base dell'OA tardiva c'è una lesione ripetuta nel tempo che altera l'equilibrio tra citochine pro-infiammatorie e anti-infiammatorie. Anche una insufficiente produzione del fattore di crescita e la sintesi delle metalloproteinasi della matrice influisce sulla progressione dell'OA. Nell'OA i condrociti subiscono modificazioni fenotipiche progressive che li trasformano dapprima in cellule ipertrofiche, poi in cellule macrofagiche e infine in cellule apoptotiche, in funzione dello stadio della patologia (Pelletier et al 1999).

I condrociti osteoartritici hanno un fenotipo alterato dall'eccessiva produzione di fattori catabolici, in particolare di metallo proteinasi e specie reattive dell'ossigeno (ROS). E' stato visto inoltre che i condrociti osteoartrosici possiedono una densità più alta di recettori per i recettori del fattore di crescita insulino-simile, ma che l'affinità di legame per quest'ultimo è fortemente diminuita. Anche in soggetti anziani è stata notata una affinità diminuita per il fattore di crescita.

Le metalloproteinasi nell'OA tardiva degradano più velocemente di quanto non venga prodotta la matrice extracartilaginea, in particolare per il contenuto di proteoglicano.

Seguendo il processo osteoartritico, si assiste alla modificazione del tessuto cartilagineo che inizialmente diventa ipertrofico, poi mineralizza e infine scompare degenerando totalmente. Condrociti articolari umani stimolati con citochine quali interleukina 1 e fattore alfa di necrosi tumorale producono alti livelli ossido nitrico il quale rende il condrocita più suscettibile all'apoptosi (Hunziker et al, 2001b; Studer et al, 1999b).

La precoce ipertrofia della cartilagine che si nota nelle OA sperimentali indotte meccanicamente, dimostra che i condrociti possiedono capacità riparative proprie (Kusuzaki et al, 2001). Durante il tentativo di riparazione la cartilagine va incontro ad ipertrofia con formazione di cluster condrocitari, incrementata

idratazione della matrice e accelerazione del turnover dei suoi componenti. Nel tentativo ripartivo i condrociti dei cluster producono grandi quantità di aggregani e di collagene di tipo II, ma sintetizzano anche molecole anomale come collagene di tipo I, II A, III e tenascine che non si trovano nella cartilagine normale (*Yasuda and Poole, 2002*). Ne risulta un tessuto calloso di resistenza ridotta rispetto alla cartilagine normale. L'iperproduzione di matrice cartilaginea guida il processo ripartivo ipertrofico, tuttavia, nonostante tale positiva reazione iniziale, si osserva in breve tempo una netta perdita di cartilagine che dimostra quanto la reazione di riparazione sia transitoria e in prospettiva inefficace (*Aigner et al, 2001; Kirsch et al, 2000*). Recentemente è stato dimostrato che i condrociti osteoartritici sovraesprimono interleukina 1 (*IL-1*) e TNF (*Tumor Necrosis Factors*).

Inoltre la degenerazione cartilaginea è causata dall'attività proteolitica della stromelina aggreganasi e della collagenasi che degradano rispettivamente gli aggregani e il collagene di tipo II della matrice. Il quadro articolare artrosico è stato visto essere composto anche da altri peptidi, come il TNF $\alpha$ , frammenti di fibronectina e taluni microcristalli, che possono stimolare la produzione di metalloproteinasi da parte dei condrociti e alimentare il processo patologico (*Yasuda and Poole, 2002*).

I cambiamenti istopatologici caratteristici della cartilagine articolare osteoartritica quali la frammentazione della superficie articolare, fessurazioni verticali e rimodellamento dell'osso periferico all'articolazione, sono cambiamenti progressivi che suggeriscono una gravità in aumento della patologia osteoartrosica (*Pritzker et al, 2005*).

Durante la progressione dell'OA si verifica una importante diminuzione della densità ossea dell'osso sub-condrale, contemporaneamente alla degenerazione della cartilagine articolare. Le alterazioni radiografiche dell'osso richiedono tempi più lunghi per essere osservabili, in quanto è necessario un cambiamento di almeno il 30% della densità ossea per essere notato radiologicamente. L'integrità della cartilagine articolare dipende da molti fattori che non riguardano il tessuto

osseo, ma non può prescindere dalle proprietà meccaniche del letto osseo sul quale è adagiata (Messner et al., 2000).

E' interessante notare che tutti gli osteoblasti durante il processo OA producono livelli più alti di TGF- $\beta$  rispetto alle cellule normali, mentre la produzione di IL-1 $\beta$  rimane simile (Massicotte et al., 2002).

Siccome la neovascolarizzazione fornisce un collegamento tra l'osso sub-condrale e la cartilagine, si è ipotizzato che molti fattori sconosciuti oltre l'IL-6 e il TGF- $\beta$  possano contribuire all'anormale rimodellamento della cartilagine osteoartritica (Malinin and Ouellette, 2000). Westacott e colleghi (1997), lavorando su espianti, ha dimostrato che gli osteoblasti osteoartritici incrementano il rilascio di glicosaminoglicani (GAGs) laddove le cellule normali non lo fanno, questo dimostra che anche gli osteoblasti, oltre ai condrociti, durante lo sviluppo dell'OA vanno incontro ad un'intensificazione del catabolismo, ma non è stato fin'ora identificato un singolo fattore responsabile della degradazione cartilaginea indotta dagli osteoblasti OA. Nel cane come nell'uomo l'età avanzata sembra favorire lo sviluppo dell'OA, la spiegazione del fenomeno può essere individuata nelle modificazioni del profilo ormonale prodotte dall'invecchiamento e più precisamente nell'alterazione dell'equilibrio tra estrogeni ed androgeni che porta al sopravvento degli estrogeni nell'ambiente intrarticolare.

Inoltre gli osteoblasti OA sono resistenti alla stimolazione dell'ormone paratiroideo ed anche questo spiega l'anormale rimodellamento del tessuto osseo e la sua sclerosi (Hilal et al., 2001).

Ricordiamo inoltre che studi effettuati sulla presenza di osteofiti o entesiofiti come manifestazione di progressione della patologia se presenti da soli non sono sufficienti a giustificarne la presenza, anche se la patogenesi della loro esatta formazione resta a tutt'oggi poco spiegata. Tuttavia la loro formazione sembra essere collegata ad una distensione della capsula articolare e della membrana sinoviale dove questa viene in contatto con la cartilagine articolare (Buckwalter et al., 2000).



Il tessuto osseo subcondrale delle articolazioni colpite da OA mostra alterazioni tipiche: condensazione, scarsa mineralizzazione e presenza di osteoblasti fenotipicamente alterati che producono più insulina like growth factor 1 IGF-1 e urokinasi (uPA) degli osteoblasti normali, mentre le IGF binding protein (IGFBP) e i livelli dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno PAI-1 non cambiano (*Hilal et al, 1999*).

Lo sbilanciamento tra PAI-1 e uPA può favorire l'idrolisi dell'IGFBP, con il risultato di liberare localmente IGF-1 che possono agire per via autocrina/paracrina intensificando la formazione di matrice ossea. L'alterazione dell'osso subcondrale, accompagnata dall'aumento di volume degli osteoidi (*tessuto costituito da fibrille collagene con focolai d'iniziale deposizione di calcio*) e dalla ridotta mineralizzazione suggerisce che un'anomala regolazione del rimodellamento osseo sia parte integrante dell'OA (*Sorrell et al, 2006*).

## TERAPIA DELL'OSTEOARTRITE

---

Gli obiettivi principali del trattamento dell'OA sono la riduzione del dolore, il contenimento dell'infiammazione e il ripristino parziale o completo della funzionalità articolare. Esistono svariate terapie proposte per la cura dell'OA, ma il trattamento medico rappresenta l'alternativa più efficace ed utilizzata. Sono descritti trattamenti conservativi di tipo farmacologico, nutraceutico e biofisico come ad esempio la PEMF therapy (*Pinna et al, 2013*) ma di seguito verranno affrontate solo le strategie farmacologiche attualmente più utilizzate.

**FANS (farmaco anti-infiammatorio non steroideo)**

Generalmente viene descritto come FANS un gruppo di sostanze in grado di sopprimere un processo infiammatorio. La classificazione è ristretta a quei principi attivi che sono in grado di sopprimere una o più fasi del metabolismo dell'acido arachidonico, tuttavia gli effetti di queste sostanze non si limitano all'interferenza con tale ciclo metabolico, dando luogo ad effetti collaterali non desiderati. Strutturalmente i FANS possono essere classificati come derivati dell'acido acetil salicilico, dell'acido propionico, degli acidi antranilici, dell'acido acetico o come derivati oxicamici.

Gli eicosanoidi, come le prostaglandine e i leucotrieni, sono derivati della membrana cellulare, e fungono da potenti mediatori dell'infiammazione, soprattutto nelle fasi finali del processo infiammatorio. Il più importante di questi composti è l'acido arachidonico (AA) che viene rilasciato nella cellula a partire dai fosfolipidi delle membrane danneggiate. All'interno della cellula l'AA serve da substrato per gli eicosanoidi. La ciclossigenasi presente in tutte le cellule, addiziona ossigeno all'AA, generando endoperossidi instabili (PGG<sub>2</sub>), che verranno poi convertiti in PGH<sub>2</sub>, precursore di tutte le prostaglandine e trombossani.

La formazione delle prostaglandine è mediata da uno dei due isomeri delle ciclossigenasi. La ciclossigenasi 1 (COX1) media la formazione di prostaglandine organiche, prodotte in molti tessuti quali tubo digerente, piastrine, cellule endoteliali, cellule renali. Le prostaglandine prodotte dalla COX1 sono costantemente presenti, garantendo l'omeostasi attraverso una serie di effetti fisiologici, che includono la protezione della mucosa gastrica, e del rene se soggetto ad alterazioni ipotensive. La ciclossigenasi 2 (COX2) è invece il prodotto di un gene ad attivazione veloce, sottoposto a rigida regolazione. La sua espressione viene drasticamente accelerata in presenza di flogosi. Le citochine infiammatorie, come il fattore necrotico tumorale (TNF) e le interleuchine stimolano l'espressione di COX2 in molte cellule tra cui quelle sinoviali,

condrocitiche, osteoblastiche e macrofagiche. La COX2 catalizza in tal modo la formazione di prostaglandine inducibili. La possibilità di inibire selettivamente le COX2 sarebbe chiaramente un vantaggio clinico non trascurabile relativamente alla sicurezza nell'utilizzo dei FANS. Va ricordato a tal proposito che la COX 2 è fisiologicamente presente nel rene e nel cervello e media un effetto citoprotettivo sulla mucosa gastrica (Febbo et al, 2009).

I FANS agiscono bloccando la prima fase della sintesi di prostaglandine inibendo la COX. Quest'azione è sia dose-dipendente, sia farmaco-dipendente ed è responsabile tanto degli effetti terapeutici quanto degli effetti indesiderati.

Questi farmaci quindi hanno anche una funzione anti-infiammatoria ed antalgica. Riepilogando l'attività anti-infiammatoria si esplica con l'inibizione della ciclossigenasi, che fa diminuire la produzione di prostaglandine pro-infiammatorie. L'attività antalgica sembra imputabile all'inibizione dell'attività delle ciclossigenasi a livello spinale. L'inibizione di queste prostaglandine aiuta a prevenire la sensibilizzazione dei nocicettori periferici.

L'induzione selettiva della COX2 è responsabile della produzione di prostaglandine implicate nella percezione del dolore, e di una infiammazione di grado relativamente basso, associata all'OA. Farmaci che inibiscono la produzione delle COX2 in modo superiore alle COX1 migliorano i sintomi clinici con minori effetti collaterali indesiderati. Per determinare l'attività specifica di un farmaco anti-infiammatorio non steroideo (FANS) sulle COX2 piuttosto che sulle COX1 sono necessari complesse prove in vitro che vanno dall'analisi di enzimi purificati ad analisi del sangue intero. I risultati di questi studi hanno lo scopo di determinare la quantità di farmaco necessaria per inibire il 50% dell'attività enzimatica specifica. La specificità viene quindi espressa come il rapporto tra la quantità di farmaco necessaria per inibire il 50% delle COX2 confrontata con la quantità di farmaco necessaria per inibire il 50% della COX1 o viceversa. I farmaci che non inibiscono in maniera differente le due ciclossigenasi

vengono detti “aspecifici”. I farmaci COX2 “specifici” sono caratterizzati invece da una differenza di concentrazione di almeno 100 volte nella concentrazione del farmaco necessaria per inibire la COX2 rispetto la COX 1 . Attualmente non esistono molecole “specifiche” per la COX2 ad uso veterinario (Everts et al, 2000).

Gli effetti collaterali sono comuni, in forme diverse, a tutti i FANS. La maggior parte degli effetti collaterali riflette l’inibizione dell’attività delle prostaglandine con sintomatologia molto spesso gastrointestinale. L’erosione gastro-duodenale e l’ulcera sono il risultato dell’inibizione della secrezione di bicarbonato e di muco, tutti dipendenti dal sistema COX1-PGE2. Di conseguenza viene a mancare il sistema di protezione gastrico.

Altro effetto non voluto riguarda l’apparato emopoietico, in particolare inducendo una ipofunzionalità piastrinica. La COX piastrinica è 250 volte più sensibile all’acetilazione rispetto a quella delle cellule dell’endotelio vasale, e questo si traduce con un difetto di aggregazione piastrinica che può durare diversi giorni.

La nefropatia è un comune effetto collaterale riscontrabile nell’uomo e nei cani soggetti a terapie prolungate con FANS. Nell’uomo e nel cane con funzionalità renale compromessa, terapie prolungate con FANS, ne determinano un peggioramento indotto dalla mancata azione protettiva svolta dalle PGE. Queste ultime infatti assicurano la necessaria vasodilatazione della midollare assicurando la continuità del flusso urinario durante gli stati di vasocostrizione arteriosa renale (Febbo et al, 2009).

Il mavacoxib è un FANS appartenente alla classe di coxib. Il principale meccanismo d’azione consiste nella inibizione della COX. (Cox et al, 2010). La COX2 viene maggiormente interessata dall’azione inibente del farmaco. Sulla base delle ricerche svolte su campioni di sangue intero di cane, la concentrazione necessaria per inibire il 20% dell’enzima COX1 è maggiore alla concentrazione

del farmaco sufficiente ad inibire l'80% della COX2. Pertanto il rapporto tra le due concentrazioni di farmaco è di 2:1 per la COX1, mentre di 40:1 per le COX2 . (Emmerich et al, 2010)

L'emivita del mavacoxib, in uno studio effettuato su cani, era compresa tra i 13,8 ed i 19,3 giorni. Il tempo di eliminazione del farmaco è risultato essere di 39 giorni, con un caso massimo di 80 gg. Questa lunga emivita è dovuta ad una particolare conformazione aromatica del celecoxib, che viene poi metabolizzato in mavacoxib. Questa conformazione abbassa notevolmente la clearance, mantenendo alti i livelli plasmatici del farmaco per lunghi periodi (Cox et al. 2010; Vilar et al, 2013) .

## **GLICOSAMINOGLICANI (GAG)**

La terapia con glicosaminoglicani, ed in particolare con lo ialuronano, o acido ialuronico, viene effettuata in modo efficace, per via intrarticolare (Qvistgaard et al, 2006) . Lo ialuronano è una sostanza ad alto peso molecolare, con viscosità elevata, in grado di favorire l'assorbimento del carico durante i movimenti rapidi, e lubrificare durante quelli lenti. Viene usato solitamente per lubrificare le articolazioni colpite da OA secca. Lo ialuronano sembra alleviare il dolore derivante dall'OA, e quindi può essere usato nella terapia della stessa (Smith 1998).

Un'altra categoria di sostanze usate per contrastare l'OA è rappresentata dai glicosamminoglicani polifosfati (PSGAG), simili allo ialuronano, ma con posologia differente. PSGAG sono classificati come farmaci modificatori della malattia OA perchè in vitro hanno dimostrato sia la capacità di inibire gli enzimi catabolici, che si attivano durante l'infiammazione delle articolazioni, sia la capacità di aumentare l'attività di alcuni enzimi con effetti anabolici. Per esempio i PSGAGs inibiscono la serina proteinasi che mediata dall' interleuchina-1, contribuisce alla

degenerazione dei proteoglicani della cartilagine e del collagene. Uno studio in vitro ha documentato gli effetti anabolici dei PSGAG che includono lo stimolo della sintesi di proteine, di collagene, di proteoglicani e di acido ialuronico in vari tessuti. I condrociti di uomo e di coniglio coltivati in presenza di PSGAGs incrementano la sintesi di proteoglicani e di acido ialuronico. In vivo i reali effetti benefici a seguito di somministrazione orale di nutraceutici sono motivo di discussione (Vandeweerdt et al, 2012; Bassleer et al, 1998) .

## **CORTICOSTEROIDI**

L'utilizzo dei corticosteroidi per via sistemica viene largamente utilizzato grazie alla loro azione anti-infiammatoria. I corticosteroidi in genere agiscono bloccando, tra le tante azioni metaboliche anche la formazione degli eicosanoidi pro-infiammatori. L'utilizzo prolungato produce tuttavia effetti collaterali ben noti. La somministrazione intrarticolare è efficiente più di quella dell'acido ialuronico e allevia la sintomatologia algica legata all'infiammazione, in quanto inibisce la produzione di citochine pro-infiammatorie, ma allo stesso tempo interferisce su molte cascate metaboliche intrarticolari. I corticosteroidi diminuiscono la produzione della matrice cartilaginea perché viene fortemente inibita la sintesi di proteoglicano (Qvistgaard et al, 2006).

## **STEROIDI ANABOLIZZANTI**

Gli steroidi anabolizzanti sono molecole che facilitano l'assimilazione delle sostanze alimentari (anaboliche) senza un equivalente aumento dell'attività catabolica. L'attività anabolica viene valutata osservando il metabolismo delle sostanze azotate e la sintesi delle proteine. La formazione di queste ultime è il risultato di un'informazione genetica contenuta nel DNA, che trasportata da RNA

messaggero negli organuli cellulari ne induce la produzione. Gli steroidi in genere hanno la funzione di mediare questo processo. (Zannetti, 2004 ).

Ogni molecola steroidea ha un proprio spettro di azione che varia a seconda della specie animale, del genere, dell'età , dello stato di nutrizione e dall'ambiente di vita (clima, stagione). Spiegare l'azione di ciascuna molecola è estremamente complesso, tuttavia per esigenze cliniche si usano due parametri di riferimento: azione anabolizzante ed azione sessuale, intesa come mascolinizzazione o femminilizzazione. L'azione anabolizzante viene analizzata e quantificata attraverso la valutazione dei prodotti ammoniacali, l'aumento di peso in animali normali o in soggetti con carenza di proteine , o in animali trattati con farmaci catabolici , o attraverso lo studio di resistenza alla fatica etc . La specifica attività miotrofica degli steroidi anabolizzanti è un parametro ampiamente utilizzato, sia nella pratica clinica che laboratoristica. (Zannetti, 2004).

L'azione androgena invece è stata oggettivata attraverso lo sviluppo dei vasi seminali e la risposta prostatica nei ratti castrati. L'azione estrogenica secondaria, derivante dalla metabolizzazione della molecola invece viene indagata attraverso effetti legati alla stimolazione di quest'ultimo ormone, come lo sviluppo dell'utero nel topo prepubere (Clark et al, 2003).

Generalmente gli steroidi anabolizzanti trovano impiego negli stadi di carenza di appetito, come terapia coadiuvante in caso di cachessie, nella terapia di lesioni ulcerative della pelle ed in alcune forme eczematose ed alopeciche. Aumentando il metabolismo basale, gli steroidi inducono un aumento simultaneo della quota di calcio depositato nella matrice ossea, favorendo la guarigione delle fratture e degli stati osteoporosici (Olson et al, 2000).

L'azione anabolizzante positiva di queste molecole è altresì osservabile in tutte quelle situazioni in cui la replicazione cellulare è di beneficio per la guarigione

dello stato di malattia, quali: difetti di crescita nei cani di razze giganti, disordini decalcificanti dell'osso o degenerativi come la miostrofia (Edwards et al, 1984)

Diversi studi stanno investigando sulla possibilità dell'utilizzo dello stanozololo e di altre molecole affini, sugli effetti e sul meccanismo d'azione della proliferazione in vitro delle cellule dello strato cartilagineo (Zhu, 2009; Zhu, 2011).

## STANOZOLOLO

---

Lo stanozololo è uno dei derivati sintetici del testosterone ed è caratterizzato da minori effetti androgeni rispetto ad altre molecole simili. Allo stesso tempo è dotato di un'azione anabolizzante quattro o cinque volte superiore rispetto gli effetti androgeni (Olson et al, 2000). Proprio per questa forte azione anabolizzante rispetto ad una relativamente bassa azione androgenica, fra le oltre cento molecole derivate dal testosterone, viene preferito nella pratica terapeutica. Di seguito vengono riportate le molecole anabolizzanti maggiormente conosciute ed utilizzate.

Generic name	Relative biological activity	
	Anabolic	Androgenic
Methyltestosterone	1	1
<b>Stanozolol</b>	<b>3.17</b>	<b>0.52</b>
Mestanolone	0.70	0.78
Methylandrostendiol	28.2	4.5
Fluoxymesterone	0.75	0.22
Norethandrolone	3.3	0.48
Oxymesterone	2.22	0.70
Oxymetholone	1.46	0.31
Methandrostenolone	2.14	0.57
Methenolone acetate	0.88	0.12
Ethylestrenol	2.42	0.19
Dimethazine	0.44	0.05

Generic name	Relative biological activity	
	Anabolic	Androgenic
Testosterone propionate	1	1
Stanolone	2.5	1.53
Costebol acetate	0.85	0.1



Nello specifico lo stanozololo presenta un'alchilazione in posizione C 17 alfa che lo rende idoneo all'inoculazione intrarticolare, in quanto lo protegge dall'azione dell'enzima aromatasi (Zannetti, 2004).

Lo stanozololo determina la stimolazione della sintesi proteica, che si traduce in un'attività trofica livello dei tessuti, con particolare evidenza a carico della muscolatura scheletrica il cui aumento di massa si associa ad un bilancio azotato positivo (Yamada et al, 2008). Il meccanismo d'azione di questi composti è legato anche alla loro affinità con i recettori per gli androgeni, proteine specifiche, situate nel citoplasma o nel nucleo, che modulano i meccanismi enzimatici della sintesi proteica. (Olson et al, 2000).

Lo stanozololo aumenta la concentrazione intracellulare di 2,3-bisfosfoglicerato negli eritrociti con incremento del rilascio tissutale di ossigeno. Questo steroide promuove inoltre la sintesi di eritropoietina con conseguente innalzamento della concentrazione dell'emoglobina, anche in corso di fenomeni anemici, che si traduce in un'incrementata capacità di trasporto dell'ossigeno a sua volta in grado di favorire la performance aerobica (Piretti et al, 2013; Ni et al, 2013).

Per quanto riguarda l'apparato scheletrico, questa molecola stimola la proliferazione di osteoblasti, la produzione della matrice ossea e la sintesi di fattori di crescita, mentre l'azione antagonista verso il paratormone e l'interleuchina1 (IL-1), che è stata dimostrata recentemente anche in vitro, previene l'effetto degenerativo sulla componente minerale. (Falanga et al, 1998; Zhu et al, 2009)

Un'altra azione positiva dello stanozololo è quella di contrastare il catabolismo proteico indotto dai glicocorticoidi che ne giustifica l'impiego nei disordini muscolari come ipotonie e ipotrofie, nelle difficoltà di consolidamento delle fratture, nella demineralizzazione del tessuto osseo (osteoporosi), nelle

patologie proteino-disperdenti come enteriti o nefropatie croniche, nelle anemie, nei ritardi dell'accrescimento e, in corso di patologie cutanee, nel promuovere la crescita dei tessuti o nello stimolarne la loro riparazione ( Beneton et al, 1991; Liao et al, 2003; Zannetti 2004).

In particolare lo stanozololo incrementa la produzione del collagene (che come visto in precedenza è la sostanza fondamentale della matrice) e di altri componenti di natura proteica della matrice cartilaginea, stimolando il trofismo del tessuto cartilagineo (Falanga et al, 1998)

Recenti studi hanno portato inoltre all'identificazione dello stanozololo, grazie alle sue peculiarità riferite alle azioni anaboliche sulla cartilagine quale unico agente terapeutico nel trattamento del collasso tracheale di origine disendocrina del cane ( et al, 2002; Adamama et al, 2009).

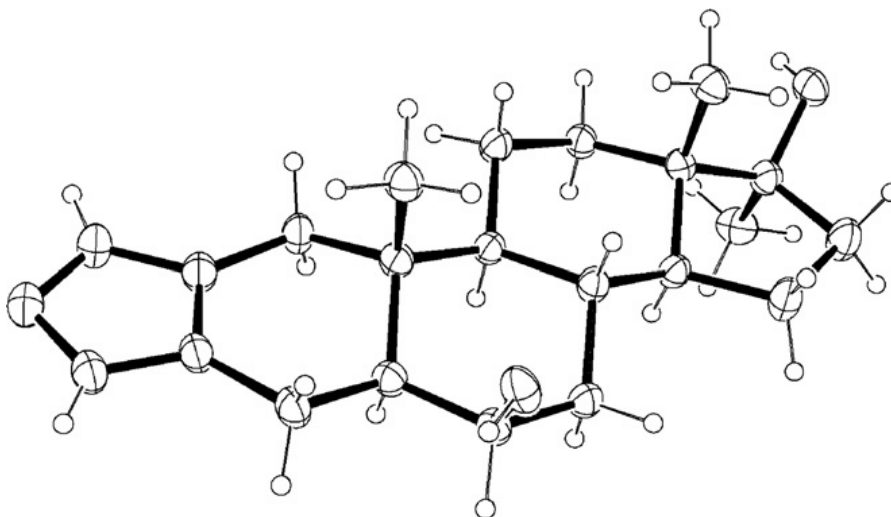


Fig. 4 CRISTALLO SINGOLO DI STANOZOLO (Stewart et al, 2009).

La misurazione della concentrazione dei nitriti nel liquido sinoviale, prima e dopo somministrazione di stanozololo, evidenzia il potente effetto antinfiammatorio del farmaco. Uno studio in questo senso, condotto in vivo su ovini, ha dimostrato che tale evento si manifesta, in un 50% dei soggetti trattati, già dopo una

settimana dalla prima iniezione mentre nei restanti lo stesso effetto si evidenzia dopo il secondo intervento (Spadari et al, 2013). Questi dati confermano "in vivo" le potenti proprietà antinfiammatorie del farmaco già emerse nel corso delle ricerche "in vitro" su colture di condrociti (Saleri et al, 2004).

Lo stanozololo agisce in misura più o meno intensa sui diversi tessuti dell'articolazione e si dimostra particolarmente attivo anche sulle cellule più refrattarie alle comuni stimolazioni metaboliche, quali i condrociti. Accelerando l'anabolismo e la moltiplicazione di queste cellule aumenta la sintesi delle componenti fondamentali della matrice cartilaginea ed in particolare di collagene e glicosaminoglicani. L'effetto antinfiammatorio dello stanozololo riduce la permeabilità capillare e l'ingresso dei granulociti nell'articolazione. Ciò si associa che questa molecola si è dimostrata in grado di bloccare i processi degenerativi della cartilagine articolare, consentendo il prevalere di quelli rigenerativi intrinseci dell'articolazione (Zhu et al, 2009).

L'azione anabolica esercitata dallo stanozololo attiva i sinoviociti che reagiscono con un incrementato metabolismo. Questo comporta un miglioramento della capacità di sintesi e produzione di ialuronato di sodio ad alto peso molecolare inducendone una sua maggiore concentrazione nel liquido sinoviale. In uno studio condotto sulla specie equina, si è osservato un abbondante aumento della produzione di liquido sinoviale. Il liquido sinoviale prodotto dalla stimolazione indotta da questo composto possiede eccellenti caratteristiche viscoelastiche, come documentato con indagini cliniche e strumentali (misurazione reologica con viscosimetro rotazionale), che si traducono in un elevato potere lubrificante, nutritivo dei condrociti e antinfiammatorio indiretto (Spadari et al, 2013).

A fronte della potente attività fibrinolitica lo stanozololo è inserito nei protocolli terapeutici dell'artrite reumatoide e della lipodermatosclerosi dell'uomo, patologie nelle quali i processi infiammatori determinano un eccessivo deposito di fibrina che può assumere, in quanto tale, un rilevante ruolo patogenetico. In

molti casi la proliferazione della membrana sinoviale e il deposito di fibrina erodono la cartilagine articolare e ostacolano il movimento articolare. Le OA con sinovite cronica riconoscono nell'ipertrofia delle membrane sinoviali e nei depositi fibrinosi la causa di intense stimolazioni dolorose. In entrambi i casi il potente effetto fibrinolitico e antinfiammatorio dello stanozololo si dimostra in grado di migliorare il quadro clinico (Belch et al, 1986).

Agli estrogeni presenti in articolazione viene attribuita la capacità di innescare il processo infiammatorio e di giocare un ruolo patogenetico centrale nell'artrite reumatoide (Capellino et al, 2014). Il prevalere degli estrogeni in sede articolare determina condizioni pro-infiammatorie favorevoli allo sviluppo delle osteoartriti. L'equilibrio androgeni/estrogeni è regolato dall'enzima aromatasi. L'aromatasi è in grado di agire sul testosterone e di modificare la sua struttura chimica in estradiolo. L'alchilazione in posizione C 17 alfa protegge e impedisce la conversione dello stanozololo in estradiolo e/o consente il blocco dell'attività aromatasica sul testosterone. In presenza di stanozololo, il testosterone e i suoi esteri, non sono convertiti in estradiolo dalla aromatasi. La persistenza dello stanozololo nell'articolazione, la sua stabilità (presenza nel liquido sinoviale fino 7 giorni nel cavallo), e il prevalere in loco degli androgeni a scapito degli estrogeni, sono alla base degli effetti osservati con la somministrazione di questo principio attivo. La persistente attività androgena dello stanozololo ripristina stabilmente l'equilibrio ormonale dell'ambiente intrarticolare, a favore degli androgeni, eliminando una causa predisponente dell'infiammazione e della degenerazione cartilaginea. Il ripristino del corretto equilibrio ormonale può essere determinante per il successo terapeutico nelle artropatie degenerative (Stewart et al, 2009).

La DL50 per os nel ratto è superiore a 4g/kg. A dosaggi orali pari a 125 mg/kg e a 625 mg/kg determina nel ratto maschio modesta riduzione dell'accrescimento e alterazioni istologiche nei testicoli e nel fegato. Nelle femmine è responsabile di

uno stimolo alla crescita. Nel cane risultano ben tollerati dosaggi orali che possono raggiungere 1g/kg (Plumb et al).

Per tassi ematici di gran lunga superiori a quelli che si ottengono nella pratica terapeutica lo stanozololo può esplicare un'influenza negativa sull'attività riproduttiva, il che porta ad escludere questa molecola da un impiego in corso di gravidanza. Non esistono in letteratura dati e osservazioni circa un'azione teratogena dello stanozololo (Clark et al, 2003). E' controindicata la somministrazione di stanozololo ad animali colpiti da carcinoma prostatico o ipertrofie prostatiche. L'impiego dello stanozololo da quanto emerso in recenti studi è controindicato in corso di squilibri ormonali. (Clark et al, 2003; Zannetti, 2004). In letteratura umana, è riportato un caso di abuso che ha condotto ad una importante ipokaliemia ed alcalosi ( Maini et. al, 2014).

Lo stanozolo, per quanto riportato sopra è indicato per la terapia di supporto alle condizioni di ridotto o alterato sviluppo scheletrico, ritardato accrescimento, ipotrofia muscolare, ipotonia neuromuscolare, osteomiodistrofia giovanile, frattura a lento consolidamento, recuperi postoperatori, convalescenze, malattie croniche debilitanti, sequele cachettizzanti di malattie parassitarie. Si può inoltre utilizzare per la terapia di supporto alle malattie infettive o tumorali, anemia, magrezza di varia origine, sindrome da malassorbimento, iporessia, leucemie granulocitarie acute, vasculiti cutanee. Inoltre si può utilizzare come terapia di supporto alle alopecie, agli eczemi alle piaghe da decubito e alle ustioni estese (Ellis et al, 1994). E' indicato inoltre per terapia di supporto all'insufficienza renale cronica e alle epatopatie acute e croniche. Correttore degli effetti catabolizzanti delle terapie cortisoniche prolungate laddove salvaguarda il trofismo muscolare e la normale mineralizzazione dello scheletro. Terapia del collasso tracheale di origine disendocrina del cane (Stargate® ; Adamama et al. 2009).

Lo stanozololo è indicato inoltre per la terapia dell'artropatia degenerativa del cavallo, per via intrarticolare (Sungate®). Tale molecola agisce sulla degenerazione delle cartilagini articolari e sulla modificazione dell'ambiente articolare.

## PARTE SPERIMENTALE

### INTRODUZIONE

---

Lo studio ha avuto come obiettivo quello di testare l'efficacia clinica dello stanozolo iniettato in articolazioni di cani affetti da OA di gomito.

Il prodotto testato è già presente in commercio con il nome di Sungate®, e la sua efficacia nel trattamento della DJD equina è assodata ed ampiamente documentata.

Ricordiamo che i principali effetti terapeutici dello stanozolo sono:

- un effetto anti-infiammatorio;
- un'induzione della sintesi di fattori trofici per la cartilagine articolare quale l'insulina like growth factor -1 ;
- una attività litica nei confronti della fibrina libera in articolazione a seguito di OA;
- una stimolazione della produzione di liquido sinoviale ad alta viscosità;
- una capacità equilibrante l'omeostasi articolare, danneggiata dalla progressione dell'OA.

Questi effetti, ed in particolare la capacità di indurre rigenerazione del tessuto cartilagineo danneggiato, hanno motivato l'indagine dell'efficacia della molecola sulla specie canina, avendo già valutato la sua validità terapeutica nella terapia della DJD del cavallo.

La terapia attualmente utilizzata nel cane affetto da OA è basata sull'utilizzo dei FANS, dei corticosteroidi o dei fosfoglicosaminociclici (PSGAG). L'azione terapeutica di quest'ultimo gruppo di molecole è buona in vitro. I PSGAG

inibiscono gli enzimi catabolici che si attivano durante l'infiammazione quali le metalloproteinasi, ialuronidasi ed elastasi.

I corticosteroidi dati per via sistemica hanno una buona efficacia anti-infiammatoria, ma se usati per lunghi periodi possono creare gravi effetti collaterali, quali ulcere gastroenteriche fino alla degenerazione della cartilagine stessa.

I FANS hanno anch'essi un'ottima azione anti-infiammatoria inibendo l'azione delle COX come visto precedentemente. Gli effetti collaterali a seguito della somministrazione orale dei FANS sono primariamente a carico dell'apparato gastroenterico, ma possono insorgere anche problemi legati alla coagulazione e all'ipofunzionalità renale ed epatica.

Lo stanozololo è usato efficacemente nella terapia dell'OA del cavallo. La funzione anabolizzante attuata sui condrociti a seguito di inoculazione intrarticolare, potrebbe essere una valida alternativa nella terapia dell'OA del cane.

L'obiettivo della ricerca è stato quello di verificare l'efficacia dello stanozololo iniettato in articolazione di cani affetti da OA di gomito, confrontato nella sua efficacia con un FANS, il mavacoxib, già utilizzato con questa indicazione è come gruppi di controllo.

## MATERIALI E METODI

---

Lo studio multicentrico, in cieco, randomizzato e con gruppi di controllo ha coinvolto diversi Ospedali Veterinari Universitari, quali l'Ospedale Didattico



Veterinario Giuseppe Gentile Università di Bologna, Parma, Perugia, Torino e strutture private.

Sono rientrati nella sperimentazione 48 cani padronali, tutti affetti da OA di gomito di natura asettica, generante una zoppia di 2° o 3° espressi in un sistema di valutazione a punti secondo Budsberg, nel periodo compreso tra aprile 2011 e dicembre 2013.

Per tutti i soggetti è stato rilasciato il “consenso informato” da parte dei proprietari.

La cecità è stata garantita dalla compresenza di due sperimentatori. Gli sperimentatori in numero di due, suddivisi in valutatore del decorso (HCC-health care collector) ed esecutore delle terapie (HCP-health care provider) , sono stati privati rispettivamente l’uno della conoscenza del farmaco somministrato all’animale, l’altro del decorso per evitare suggestioni soggettive relative all’efficacia del trattamento.

I dati ottenuti relativi all’evoluzione dell’artropatia sono stati raccolti in apposite cartelle cliniche.

Una randomizzazione predisposta e predeterminata dallo Sponsor ha suddiviso i casi trattati in :

- 15 gomiti trattati con il prodotto test stanozolo (GRUPPO S) ;
- 15 gomiti trattati con il prodotto di controllo mavacoxib (GRUPPO T) ;
- 18 gomiti trattati sia con il prodotto test sia con il prodotto di controllo (GRUPPO ST).

L’assegnazione del trattamento al caso clinico è stata attribuita secondo lista di randomizzazione. Il numero di trattamento è diventato il numero indicativo del soggetto nello studio.

La terapia è durata un mese per i cani trattati con stanozololo, nel quale sono state effettuate 3 iniezioni della molecola a distanza di 15 gg l'una dall'altra (giorno 0, giorno 15 e giorno 30) .

I cani trattati con mavacoxib hanno ricevuto la somministrazione per via orale del farmaco al giorno 0, 15 e 45, per una durata di 45 gg di terapia.

Complessivamente la durata della sperimentazione è stata 60 giorni per caso, tempo in cui è stata valutata la progressione della malattia articolare.

## CRITERI DI INCLUSIONE

---

Sono stati ammessi allo studio cani aventi:

- età compresa tra 12 mesi e 15 anni;
- peso compreso tra 10 e 60 Kg;
- sesso maschile o femminile di qualsiasi razza;
- zoppia di 2°-3° grado mono o bilaterale, generata da OA di gomito di natura asettica, o generata da displasia e/o fratture articolari previa pregressa riduzione o fissazione, almeno 30 giorni antecedenti l'arruolamento.

I cani colpiti da OA complicate da corpi liberi articolari sono stati arruolati solo dopo l'asportazione degli stessi, con la tempistica sopra riportata.

## CRITERI DI ESCLUSIONE

---

Non sono rientrati a far parte dello studio cani:

- cachettici;

- in gravidanza o in allattamento
- che presentassero zoppie generate contemporaneamente da OA di più articolazioni dello stesso arto;
- con zoppie di 1° e 4° grado;
- portatori di zoppie generate da fratture articolari non ridotte o da corpi liberi articolari non asportati o derivanti da artriti settiche;
- che durante la sperimentazione o nei 15 giorni precedenti la visita di pre-inclusione avessero ricevuto farmaci antinfiammatori per via sistemica e/o locale (FANS, acido ialuronico, sulfaminoglicani, corticosteroidi e/o associazioni) e/o con farmaci interferenti (acido ialuronico, sulfaminoglicani-glucosamine, corticosteroidi e/o associazioni).
- che durante la sperimentazione o nei 30 giorni precedenti la visita di inclusione abbiano ricevuto farmaci anabolizzanti.

Sono stati inoltre esclusi dallo studio i soggetti che presentassero sintomi riconducibili a gravi patologie renali, gravi patologie epatiche o neoplasie sospette o conclamate.

Dopo l'ammissione allo studio, sono stati esclusi 6 casi, di cui 3 per mancato iter prefissato per la raccolta dei dati, 2 per decesso del paziente, ed 1 per una somministrazione concomitante di un FANS non prevista.

## TRATTAMENTO

---

### **Prodotto test - GRUPPO S**

Il farmaco utilizzato per il test è stato lo stanozololo in sospensione acquosa iniettabile alla concentrazione di 3mg/ml - ACME srl , in siringhe precaricate sterili alla dose di 0,5 ml (cioè contenenti 1,5 mg di principio attivo).

Il trattamento ha previsto la somministrazione intrarticolare del prodotto per 3 volte, distanziate di 15 giorni l'una dall'altra. E' stata perizia dei veterinari esecutori della terapia inoculare lo stanozololo all'interno dell'articolazione, facendo estrema attenzione a non versarne nei tessuti peri-articolari. Sono state sempre eseguite prove quali estrazione del liquido sinoviale e test di resistenza all'inoculo prima di introdurre il farmaco in oggetto.

### **Prodotto di controllo- GRUPPO T**

Il prodotto di controllo è stato il mavacoxib in compresse per os, tramite la formulazione commerciale Trocoxil®. La posologia del farmaco ha seguito quanto riportato nel foglietto illustrativo. A seconda del peso del cane da trattare sono state seguite le seguenti somministrazioni:

- Cani di 5 – 6 kg di peso: 2 compresse (Trocoxil 6 mg)
- Cani di 7 – 10 kg di peso: 1 compressa (Trocoxil® 20 mg)
- Cani di 11 – 15 kg di peso: 1 compressa (Trocoxil® 30 mg)
- Cani di 16 – 20 kg di peso: 2 compresse (Trocoxil® 20 mg)
- Cani di 21 – 23 kg di peso: 1 compressa (Trocoxil® 20 mg); 1 cpr (Trocoxil 30 mg)
- Cani di 24 – 30 kg di peso: 2 compresse (Trocoxil® 30 mg)
- Cani di 31 – 37 kg di peso: 1 compressa (Trocoxil® 75 mg)
- Cani di 38 – 47 kg di peso: 1 compressa (Trocoxil® 95 mg)
- Cani di 48 – 52 kg di peso: 2 compresse (Trocoxil® 30 mg); 1 cpr (Trocoxil 75 mg)
- Cani di 53 – 62 kg di peso: 1 compressa (Trocoxil® 30 mg); 1 cpr (Trocoxil 95 mg)
- Cani di 63 – 75 kg di peso: 2 compresse (Trocoxil® 75 mg).

### **Prodotto test e prodotto di controllo - GRUPPO ST**

Il terzo gruppo di pazienti è stato trattato con entrambi i farmaci, secondo le posologie sopra descritte. Il prodotto test alla concentrazione di 3 mg/ml in dose di 0,5 ml è stato oggetto di infiltrazione intrarticolare in tre sedute distanziate le une dalle altre di 15 gg, mentre il prodotto di controllo ha seguito la somministrazione per os ai giorni 0, 15 e 45.

I trattamenti sono stati forniti dalla Ditta sponsor dello studio (ACME srl), in buste chiuse ed identificative il numero di trattamento.

## PROCEDURA OPERATIVA

---

Prima dell'inizio di ogni trattamento è stato fatto firmare il "consenso informato" e contestualmente sono stati riportati i dati anagrafici del proprietario in cartelle cliniche. La valutazione iniziale del paziente e la somministrazione delle terapie, sia con il prodotto test, sia con prodotto di controllo, sia con l'associazione di entrambi, è stata effettuata dall' HCP (esecutore).

### **Visita di inclusione e inizio del trattamento (T 0)**

Durante la prima visita è stata sempre compilata la scheda di raccolta dati, nella quale è stata riportata la data d'inizio della terapia, i dati identificativi del paziente e l'anamnesi dell'artropatia.

Si è quindi proceduto con l'esame clinico generale (EOG) ed il prelievo di sangue, per la verifica della rispondenza dei criteri d'inclusione.

La procedura clinica ha previsto poi la valutazione del gomito colpito con l'esame obiettivo particolare (EOP) dell'articolazione valutandone tumefazione, ipertermia, ectasia della capsula, dolorabilità alla palpazione e ai movimenti flesso-estensori.

La visita è proseguita valutando l'escursione articolare (ROM-range of motion) e il grado di zoppia.

Si è eseguito quindi un esame radiografico, nelle due proiezioni ortogonali come indicato nelle procedure operative standard (SOP) .

L'HCP a questo punto, dopo aver diagnosticato un artropatia di gomito, ha verificato se il paziente confermasse la sua corrispondenza ai criteri di inclusione e non rispondenza ai criteri di esclusione.

I pazienti rientrati nei criteri d'inclusione hanno proseguito la procedura con sedazione, prelievo di liquido sinoviale e successiva somministrazione del trattamento.

### **Somministrazione dei trattamenti nei tre gruppi di studio**

Il veterinario HCP, responsabile delle somministrazioni, ha effettuato il trattamento secondo quanto riportato precedentemente riguardo la posologia dei farmaci ed in particolare:

-GRUPPO S (stanazololo) le somministrazioni, successive al giorno 0, con il prodotto test sono state effettuate al giorno 15 e al giorno 30 dopo la visita effettuata dall'HCC per la valutazione dell'evoluzione dell'artropatia e per la sua compatibilità per il proseguo con la sperimentazione.

-GRUPPO T (mavacoxib), il farmaco sotto forma di compresse è stato somministrato dall'HCP secondo le modalità indicate nel foglietto illustrativo. Dopo la prima somministrazione al giorno 0, è stato somministrato al giorno 15 e al giorno 45 dopo la visita effettuata dall'HCC per la valutazione dell'evoluzione dell'artropatia.

-GRUPPO ST (Stanozololo e Mavacoxib) le somministrazioni sono state effettuate dopo la prima visita al giorno 0, al giorno 15 per entrambi i prodotti, al giorno 30 per stanozololo e al giorno 45 per mavacoxib. Dopo ogni somministrazione il cane è stato tenuto sotto osservazione per 2 ore.

## **Valutazione dell'andamento clinico**

Le visite di controllo sono state eseguite a tempi prefissati di 15, 30, 45 e 60 giorni dall'inizio del trattamento. Lo sperimentatore HCC (valutatore) ha raccolto e riportato nell'apposita cartella clinica tutte le informazioni del soggetto al fine di valutare il proseguo della terapia e la successiva somministrazione da parte dell' HCP, ed in particolare ha valutato:

- lo stato di salute del paziente;
- l'EOP del gomito affetto da OA;
- i sintomi e la condizione infiammatorio-degenerativa dell'articolazione OA;
- il grado di zoppia;
- gli eventuali effetti collaterali o indesiderati del prodotto somministrato per la cura dell' OA;
- le eventuali terapie concomitanti effettuate durante il periodo d'osservazione;

La figura dell'HCC ha operato, come detto in precedenza, in cieco per non subire influenze relative al tipo di trattamento effettuato.

## **Sedazione**

La sedazione si è vista necessaria per i prelievi di liquido sinoviale ed i trattamenti con stanozololo intrarticolare.

Una volta eseguito l'EOG e gli esami ematobiochimici si è proceduti con la sedazione, utilizzando Dexdomitor® 0.01 ml/kg (5 µg/kg di dex-medetomidina) e Nargesic® 0.02 ml/kg (butorfanolo 0.2 mg/kg) IM, seguiti dalla somministrazione, se richiesto dalla situazione anestesiológica, di propofol alla quantità di 2 mg/kg.

## **Esame Radiografico del gomito**

L'esame radiografico è stato effettuato nelle due proiezioni ortogonali, sagittale dorso-ventrale e medio-laterale seguendo le linee guida dell' International Elbow Working Group (IEWG).

La proiezione dorso-ventrale è stata eseguita con il paziente in posizione prona e con l'arto interessato esteso in avanti; il gomito appoggiato alla cassetta radiografica e la mano pronata di circa 30° . La testa ed il collo del paziente portati fuori dal fascio radiogeno. L'esame radiografico è stato sempre eseguito al giorno 0 ed al giorno 60, per una totalità di 4 radiogrammi per caso trattato.





FIG. 5: PROIEZIONI RADIOGRAFICHE MEDIO LATAREALE (A DX) E DORSO-VENTRALE (A SX) DI GOMITO, ESEGUITE SECONDO L'IEWG.

La proiezione medio-laterale ha previsto il paziente posto in decubito laterale ipsilaterale all'arto da radiografare. Il fascio radiogeno è stato centrato nel capitello omerale e il braccio flessa a formare un angolo di circa  $45^{\circ}$ .

### **Procedura SOP per l'attribuzione del punteggio radiografico**

Le due radiografie del gomito sono state valutate secondo una procedura standard che ha previsto l'attribuzione di un punteggio da inserirsi in griglia di lettura. La sommatoria dei punteggi ha dato un valore per ogni studio radiografico.

In appendice 1 è presente la procedura SOP per l'esecuzione e attribuzione del punteggio radiografico.

### **Infiltrazione articolare del gomito**

L'artrocentesi ha previsto l'inserimento di un ago da 18G all'interno dell'articolazione con accesso latero-caudale. Mantenendo il gomito in estensione, l'ago è stato introdotto immediatamente di fianco l'olecrano.

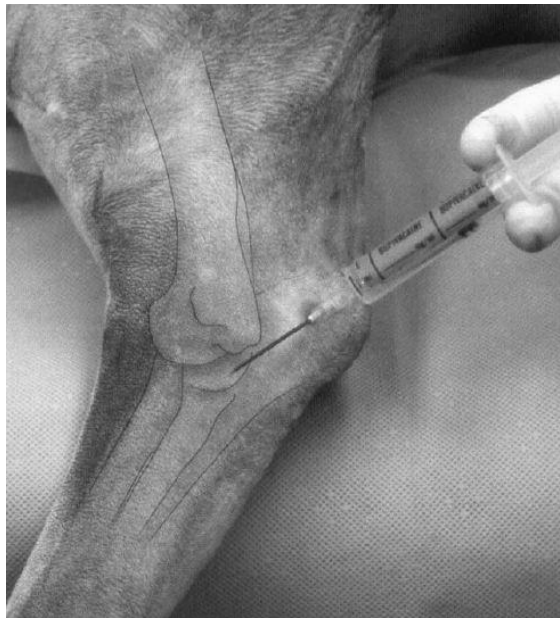


FIG. 6: RAPPRESENTAZIONE DI UN INFILTRAZIONE ARTICOLARE DI GOMITO NEL CANE.

Tramite l'infiltrazione di gomito è stato possibile prelevare il liquido sinoviale e introdurre lo stanozololo quando previsto.

### **Valutazione del grado di zoppia**

Gli sperimentatori si sono esercitati prima dell'inizio della prova sulla valutazione dell'esame dell'andatura e quindi sulla classificazione dei gradi di zoppia, per poter omologare i loro giudizi. L'esame dell'andatura è stato supportato da filmati, che oltre a documentare il grado di zoppia, sono stati valutati da terzi quando la determinazione del grado fosse risultata dubbia. I diversi gradi di

zoppicatura sono stati assegnati secondo uno schema prestabilito riassunto di seguito:

- *Grado 0* Normale in stazione e durante il movimento;
- *Grado 1* Normale in stazione, lieve zoppia durante le andature;
- *Grado 2* Zoppia da lieve a moderata a tutte le andature;
- *Grado 3* Carico parziale in stazione, zoppia grave durante l'andatura;
- *Grado 4* Assenza di carico in stazione e durante le andature.

Tale classificazione è stata redatta secondo Budsberg et. all 2007.

### **Risposta alle manipolazioni passive dell'articolazione (punteggio 0-4)**

Lo sperimentatore alla prima visita (HCP a T0, mentre HCC alle successive sedute) ha effettuato manipolazioni sull'articolazione affetta da OA quali movimenti flesso estensori del gomito, digitopressione dei recessi sinoviale ed in corrispondenza della capsula sinoviale. Sono stati eseguiti anche movimenti di stress articolare quali la digitopressione nei recessi sinoviali simultanea a moderati movimenti di pronosupinazione dell'avambraccio.

Le risposte algiche o di intolleranza sono state quindi riportate a punti nelle cartelle cliniche di ogni paziente come segue:

- grado 0 nessuna risposta alle manipolazioni;
- grado 1 risposta lieve, con paziente che sposta la testa verso l'altra parte;
- grado 2 risposta moderata, con tentativo di sottrarsi da parte dell'animale;
- grado 3 risposta significativa, con vocalizzazioni e/o manifesta aggressività;
- grado 4 impossibilità di manipolare o palpare il gomito.

### **Viscosità del liquido sinoviale (espressa in cm)**

Quando presente e prelevabile il liquido sinoviale è stato valutato in base alla caratteristica apprezzabile relativa alla sua viscosità. Una quantità di circa 0.3 ml posta tra indice e pollice dello sperimentatore è stata misurata in centimetri fino alla rottura del filo viscoso del liquido stesso. I prelievi di liquido sinoviale sono stati eseguiti ad ogni visita di controllo.

### **Quantità del liquido sinoviale (0-2)**

Allo stesso modo, al tempo dei prelievi, lo sperimentatore ha potuto valutare e riportare in cartella clinica la quantità di liquido sinoviale estratto dall'articolazione, attraverso una scala a punti. Una quantità di liquido sinoviale normale prelevabile dall'articolazione è stata fissata per 0.5 ml. I punteggi riportati in cartella hanno rispettato quanto segue:

- punteggio 0                      quantità normale;
- punteggio 1                      quantità ridotta;
- punteggio 2                      quantità aumentata.

### **Valutazione dell'ectasia capsulare (0-2)**

Alle visite cliniche è stato valutato inoltre il paramento relativo all'ectasia della capsula articolare, apprezzabile mediante palpazione. E' stato attribuito un punteggio crescente al crescere della gravità del turgore articolare. La valutazione riportata in cartella ha seguito quanto riportato:

- punteggio 0                    ectasia capsulare assente;
- punteggio 1                    ectasia capsulare moderata;
- punteggio 2                    ectasia capsulare presente;
- punteggio 3                    ectasia capsulare molto evidente.

### **Range of Motion (ROM)**

L'escursione del movimento articolare (ROM) è stata misurata ad ogni seduta tramite goniometro da uno dei due sperimentatori. Il goniometro ortopedico è stato applicato lateralmente al braccio, ponendo il fulcro in corrispondenza del capitello omerale, il punto più prossimale in corrispondenza del tubercolo maggiore dell'omero ed il punto più distale medialmente all'epifisi distale dell'ulna, appena sopra il carpo. Le misurazioni effettuate sono state riportate, indicando con un valore numerico l'escursione di movimento del gomito, espressa in gradi.

# RISULTATI

## STATISTICA DESCRITTIVA

---

Lo studio è stato condotto su 48 gomiti di cani di proprietà , la cui età media era di  $83,5 \pm 37,7$  mesi (circa 3,5 anni).

Seguendo il principio di randomizzazione sono stati assegnati 15 casi al trattamento con stanozololo (GRUPPO S) , 15 casi al trattamento con mavacoxib ( GRUPPO T )e 18 casi al trattamento concomitante di stanozololo e mavacoxib ( GRUPPO ST ).

I cani aventi OA di gomito appartenenti al gruppo S avevano l'età media di  $82,2 \pm 39,2$  mesi e il peso medio era di  $33,6 \pm 3,2$  Kg . Erano presenti 9 soggetti maschi e 6 femmine, e di questi, 14 casi sono stati classificati come cani da compagnia ed 1 da lavoro.

I 15 cani facenti parte gruppo T avevano l'età media di  $94 \pm 32,8$  mesi e un peso medio di  $32,8 \pm 9,1$  Kg . Questo gruppo era composta da 9 soggetti di sesso maschile e 6 soggetti di sesso femminile. Di questi 12 erano cani da compagnia e 3 erano cani da lavoro.

Il terzo gruppo ST aveva un età media di  $74,4 \pm 41,3$  mesi, un peso medio di  $30,6 \pm 7,4$  Kg e al suo interno vi erano 13 soggetti di sesso maschile e 5 di sesso femminile. Un numero di 14 soggetti sono stati identificati come cani da compagnia, 3 sono stati indicati come cani da lavoro e 1 a duplice attitudine.

Di seguito viene riportato uno schema riassuntivo le caratteristiche della popolazione oggetto di studio.

	Gruppo S (15)	Gruppo T (15)	Gruppo ST (18)
ETÀ (mesi)			
Media $\pm$ dev.st.	82,2 $\pm$ 39,22	94 $\pm$ 32,79	74,44 $\pm$ 41,30
PESO (kg)			
Media $\pm$ dev.st.	33,6 $\pm$ 3,2	32,85 $\pm$ 9,05	30,65 $\pm$ 7,37
SESSO			
Femmine	6	6	5
Maschi	9	9	13
ATTIVITÀ			
compagnia	14	12	15*
lavoro	1	3	4*

I soggetti rientranti nello studio appartenevano a 11 differenti razze. In particolare erano presenti nel gruppo S 7 Labrador, 3 Meticci, 2 Pastori Tedeschi, 2 Bulldog Inglese, ed 1 Golden Retriever.

Al gruppo T appartenevano 8 cani di razza Labrador, 3 Meticci, 2 Epagneul Breton, 1 Pastore Tedesco, 1 Rottweiler .

Il gruppo ST era invece composto da 8 cani di razza Labrador, 3 Meticci, 2 Golden Retriever, 1 Springer Spaniel, 1 Setter inglese, 1 Pointer, 1 Kurzhaar ed 1 American Staffordshire Terrier.

<b>Razza</b>	<b>S</b>	<b>T</b>	<b>ST</b>
Amstaf			1
Breton		2	
Bulldog inglese	2		
Golden retriever	1		2
Kurzhaar			1
Labrador	7	8	8
Meticcio	3	3	3
Pastore tedesco	2	1	
Pointer			1
Rottweiler		1	
Setter inglese			1
Springer spaniel			1

Nei cani in oggetto di studio il 96% di essi aveva già attuato in passato o in data antecedente di almeno 15 giorni l'inizio delle terapie sperimentali, delle terapie sistemiche o locali o entrambe, nei confronti dell'OA di gomito. Il trattamento era stato di tipo sistemico nel 77% dei casi, mentre il 23% delle terapie erano state locali tramite infiltrazione intrarticolari.



Nel gruppo S il 73,3% dei trattamenti precedenti era rappresentato da un corticosteroide, da un FANS o da glicosaminoglicani (GAG). Di questi l'81% dei trattamenti era rappresentato da un antinfiammatorio non steroideo.

Nello stesso gruppo S il 53% dei trattamenti era costituito da terapie locali con corticosteroidi, GAG o ialuronato di sodio.

Dei cani appartenenti al gruppo T la totalità dei trattamenti precedenti era stata effettuata con farmaci anti-infiammatori non steroidei (73%) o con GAG assunti per os ( 27% ) . Di questo gruppo un cane ha ricevuto la terapia locale tramite infiltrazione intrarticolare, con GAG .

Il 94% dei trattamenti effettuati ai soggetti appartenenti al gruppo ST era costituito da terapia sistemica con corticosteroidi, FANS o GAG. Di questi il 13 trattamenti (72%) erano stati effettuati con FANS.

Nello stesso gruppo il 22% dei trattamenti nel periodo antecedente l'inizio della sperimentazione era rappresentato da corticosteroidi o con ialuronato di sodio per inoculazione intrarticolare.

Di seguito si riporta la tabella riassuntiva dei dati appena descritti relativi ai trattamenti.

TRATTAMENTI		Gruppo S		Gruppo T		Gruppo ST
<b>SISTEMICI</b>						
<b>Corticosteroidi</b>		1		-		1
<b>FANS</b>		9		11		13
<b>Glicosaminoglicani</b>		1		4		3
<b>LOCALI</b>						
<b>Corticosteroidi</b>		3		-		2
<b>Glicosaminoglicani</b>		2		1		-
<b>Ialuronato di sodio</b>		3		-		2

L'OA di gomito alla visita di inclusione aveva indotto una zoppia di tipo sub-acuto o cronico.

Il gruppo S presentava l'80% dei pazienti con una zoppia di tipo cronico ed il restante 20% con zoppia di tipo sub-acuto o cronico riacutizzato. Lo stesso quadro è stato per le zoppie del gruppo T . Il gruppo ST presentava alla visita di inclusione il 66 % dei pazienti con una zoppia di tipo cronico, un 22% dei pazienti con zoppia riacutizzata su un quadro cronico e il restante 12% con zoppia di tipo sub-acuto.

Alla visita di inclusione il 63% della totalità del campione presentava una patologia osteoartrosica generante zoppia con andamento stabile, il 33% dei

soggetti aveva avuto un peggioramento della patologia, e il restante 4% dei soggetti aveva avuto un miglioramento.

Di seguito vengono riportati i casi sopra descritti suddivisi nei vari gruppi di trattamento.

	Gruppo S (15)	Gruppo T (15)	Gruppo ST (18)
CARATTERISTICHE ZOPPIA alla visita d'inclusione			
cronica	12	12	12
cronica riacutizzata	2	3	4
subacuta	1	-	2
stabile	10	8	12
diminuita	-	1	1
aumentata	5	6	5

Si sono analizzate le voci sopra riportate, studiandone la variazione e l'andamento nel tempo.

## **ZOPPIA**

Si sono raccolti tutti i dati relativi ai punteggi valutati durante le visite cliniche per ciascuno dei 48 casi trattati al T0 (prima visita) a T15, 30, 45 e 60, suddividendoli per i 3 gruppi di trattamento. Nessun caso, tra quelli arruolati mostrava una zoppia di 0°, 1° e 4° come previsto dai criteri di inclusione al tempo T0.

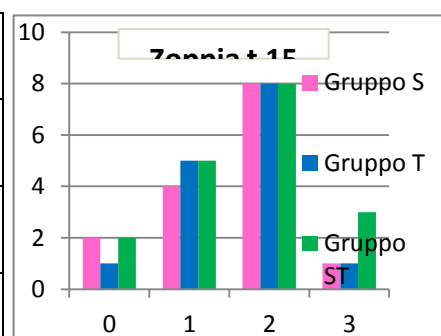
## GIORNO 0

GRADO	0	1	2	3	4
S	0	0	10	5	0
T	0	0	8	7	0
ST	0	0	15	3	0

Di seguito sono riportate le tabelle riassuntive il numero di casi aventi zoppia di grado 0, 1, 2 e 3 per i diversi gruppi di trattamento S, T, e ST al tempo 15, 30, 45 e 60.

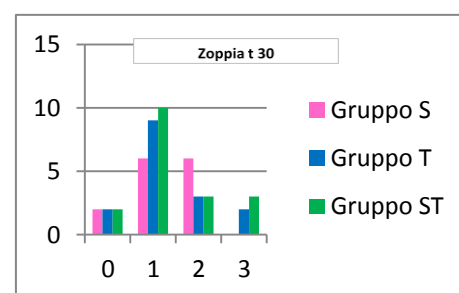
## GIORNO 15

GRADO	0	1	2	3
S	2	4	8	1
T	1	5	8	1
ST	2	5	8	3



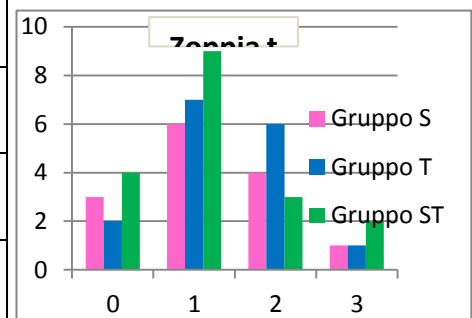
## GIORNO 30

GRADO	0	1	2	3
S	2	6	6	0
T	2	9	3	2
ST	2	10	3	3



# GIORNO 45

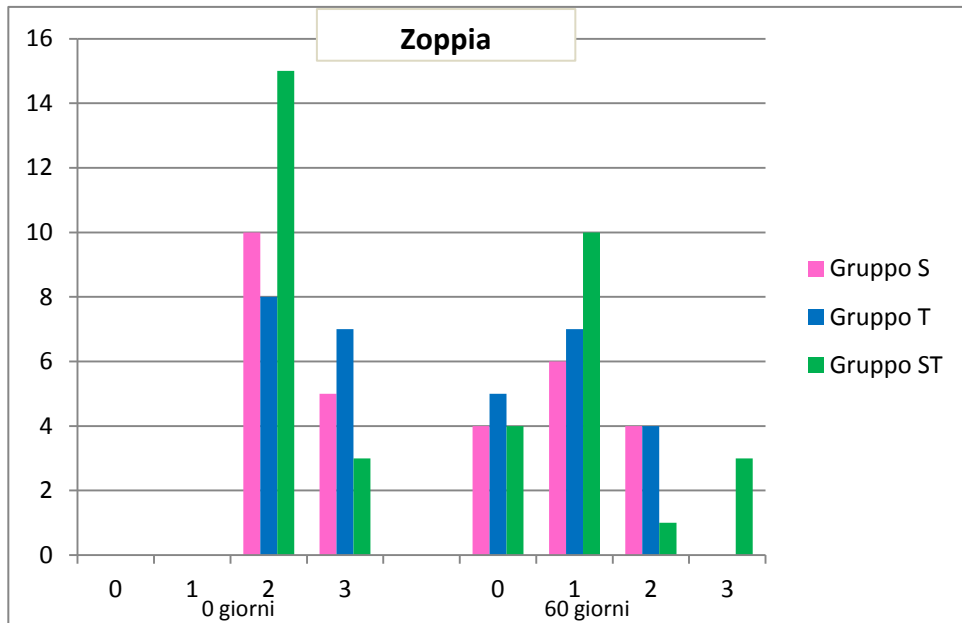
GRADO	0	1	2	3
S	3	6	4	1
T	2	7	6	1
ST	4	9	3	2



# GIORNO 60

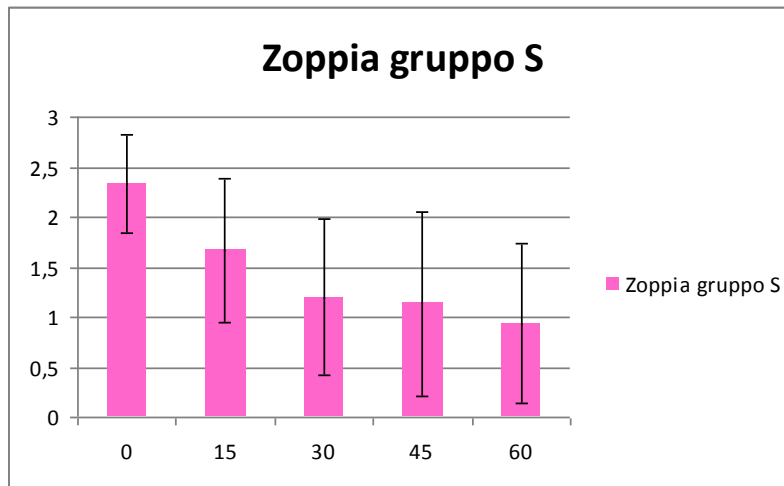
GRADO	0	1	2	3
S	4	6	4	0
T	5	7	4	0
ST	4	10	1	3

Il grafico sottostante rappresenta le distribuzioni del numero di soggetti per ogni trattamento suddivisi per grado di zoppia, al tempo d'inizio trattamento e fine.

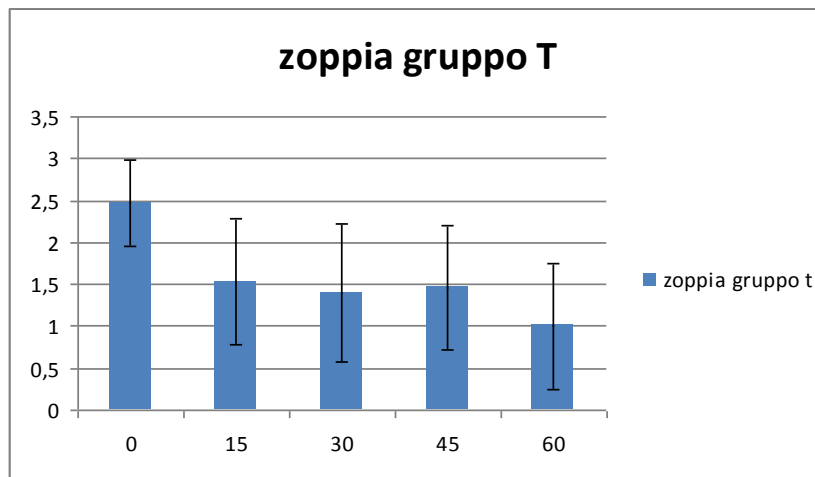


Lo studio dell'evoluzione del grado di zoppia, che rappresenta uno dei parametri più importanti da valutare nel presente studio, si può altresì rappresentare osservando i valori medi nei tre diversi gruppi di trattamento.

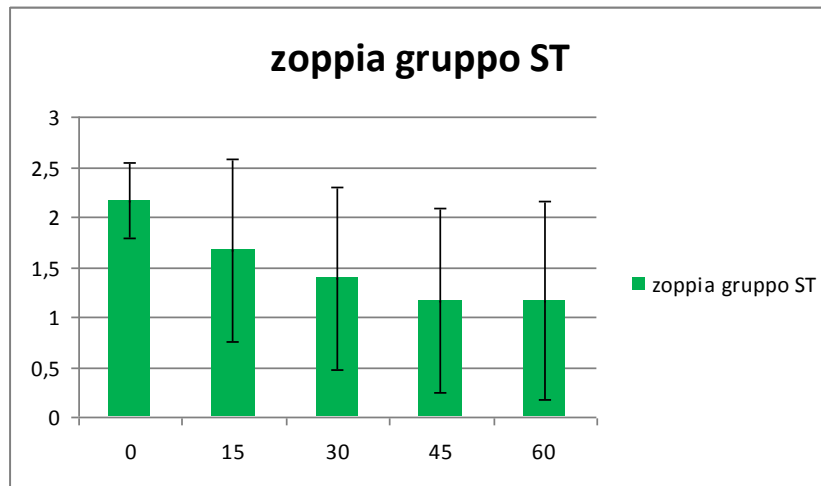
I casi appartenenti al gruppo S hanno un valore medio di  $2,3 \pm 0,5$ , a T15 di  $1,7 \pm 0,7$ , a T30 di  $1,2 \pm 0,7$  e al termine della sperimentazione un valore di  $0,9 \pm 0,8$ .



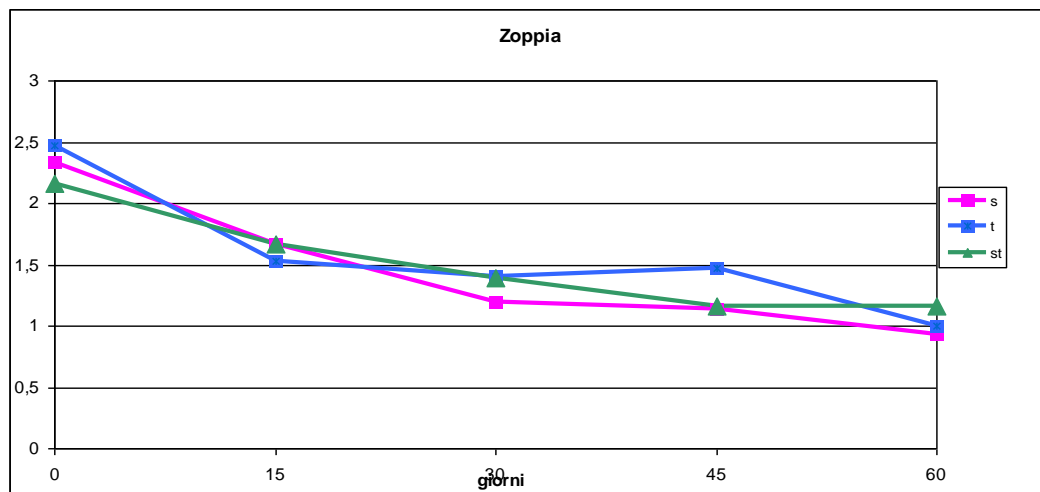
I casi appartenenti al gruppo T hanno al tempo T0 un valore medio di  $2,5 \pm 0,5$ , a T15 un valore di  $1,5 \pm 0,7$ , a T 45 un valore di  $1,4 \pm 0,7$  e a T60 un valore di  $1 \pm 0,8$ .



I casi trattati con entrambi i farmaci appartenenti al gruppo ST hanno avuto invece una media dei valori zoppia al tempo 0 di  $2,1 \pm 0,4$ , a T15 valori di  $1,7 \pm 0,9$ , a T 30 valori di zoppia pari a  $1,3 \pm 0,9$  e a T60 valori di  $1,6 \pm 1$ .



I dati relativi all'andamento del parametro zoppia nei tre gruppi di studio possono essere riassunti graficamente come segue. Il grafico mostra l'andamento medio della zoppia dall'inizio del trattamento al giorno 60. Esso comprende la totalità dei 48 casi trattati.



E' evidente la diminuzione progressiva della zoppia durante le osservazioni fatte nei 60 giorni. La zoppia è diminuita nei tre gruppi trattati in modo simile.

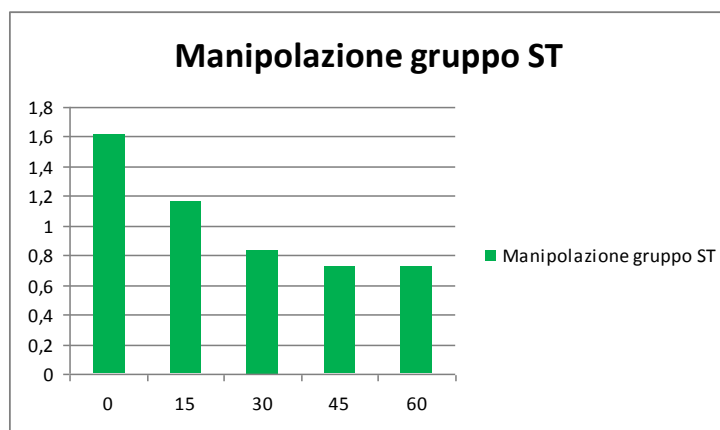
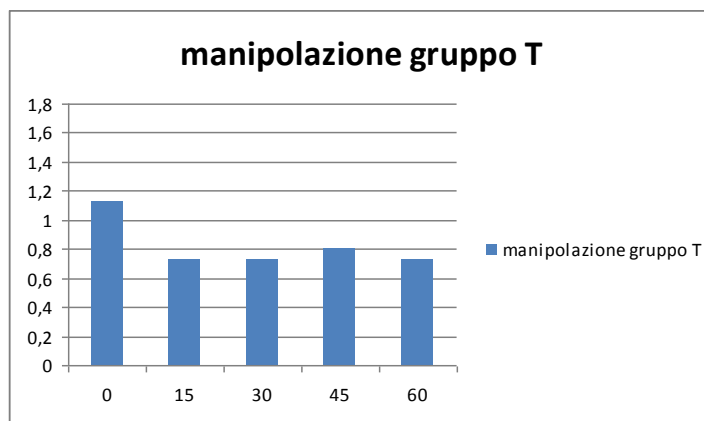
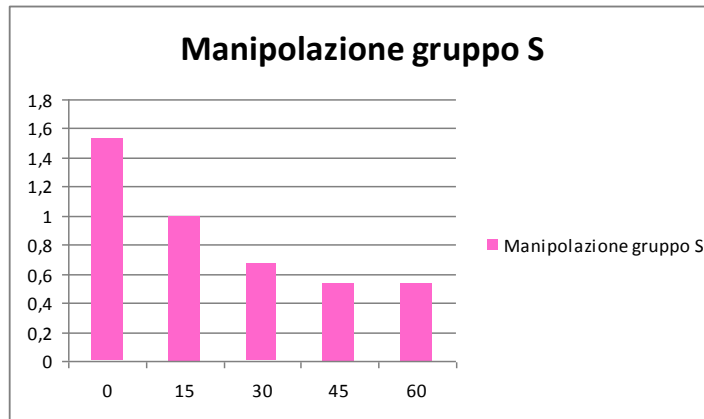


## RISPOSTA ALLE MANIPOLAZIONI

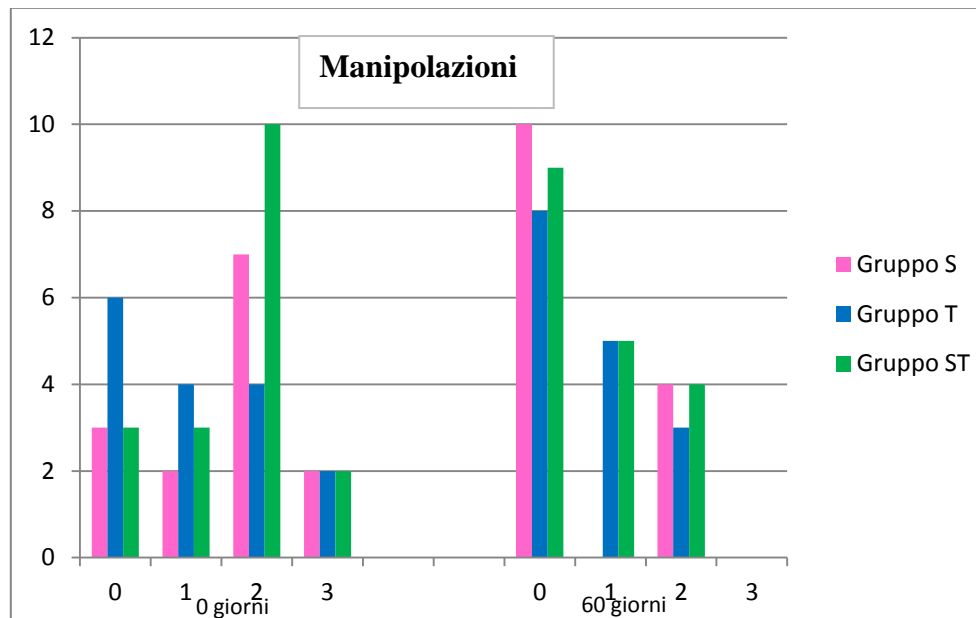
Il parametro in oggetto è stato elaborato come in precedenza valutando la distribuzione dei casi trattati nei tre gruppi, ad ogni seduta. I casi sono stati suddivisi a seconda del punteggio a loro attribuito.

punteggio		0	1	2	3
T0	S	3	2	7	2
	T	6	4	4	2
	ST	3	3	10	2
T15	S	5	4	5	0
	T	6	8	2	0
	ST	5	5	8	0
T30	S	9	1	3	1
	T	9	4	2	1
	ST	6	9	3	0
T45	S	9	2	3	0
	T	7	6	3	0
	ST	10	4	3	1
T60	S	10	0	4	0
	T	8	4	4	0
	ST	9	5	4	0

Di seguito si riportano 3 istogrammi per identificare come la manovrabilità dell'articolazione colpita da OA si modifichi durante la durata della sperimentazione. I 3 grafici riguardano rispettivamente il gruppo S , gruppo T ed il gruppo ST. Si noti come l'andamento si similare nel gruppo S e nel gruppo ST, mentre sembra dissimile nel gruppo T .

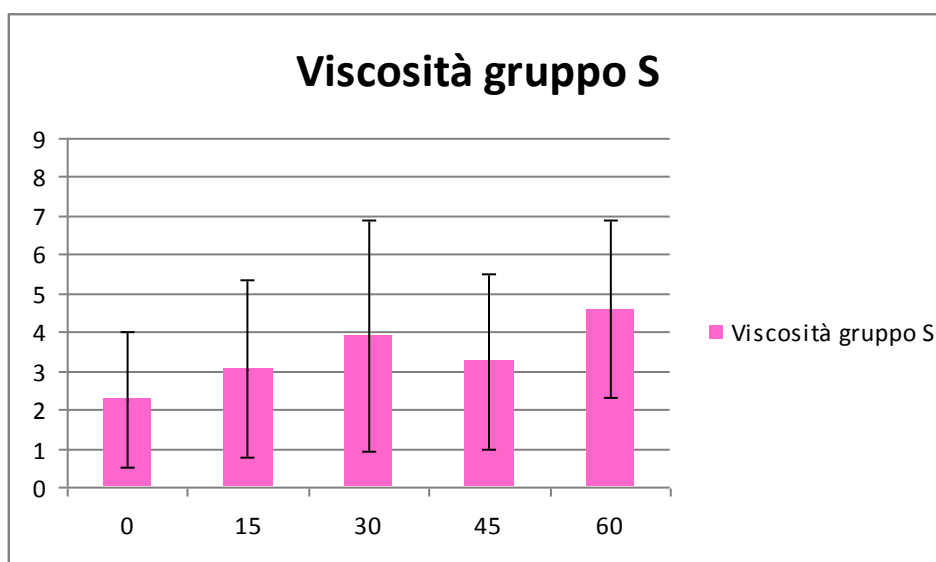


Il grafico che segue rappresenta invece l'insieme dei casi trattati nei 3 gruppi di studio a T0 e T60. E' possibile notare la maggiore altezza degli istogrammi in corrispondenza del punteggio 0 di manovrabilità al tempo T60, in particolare per i casi trattati nel gruppo S.



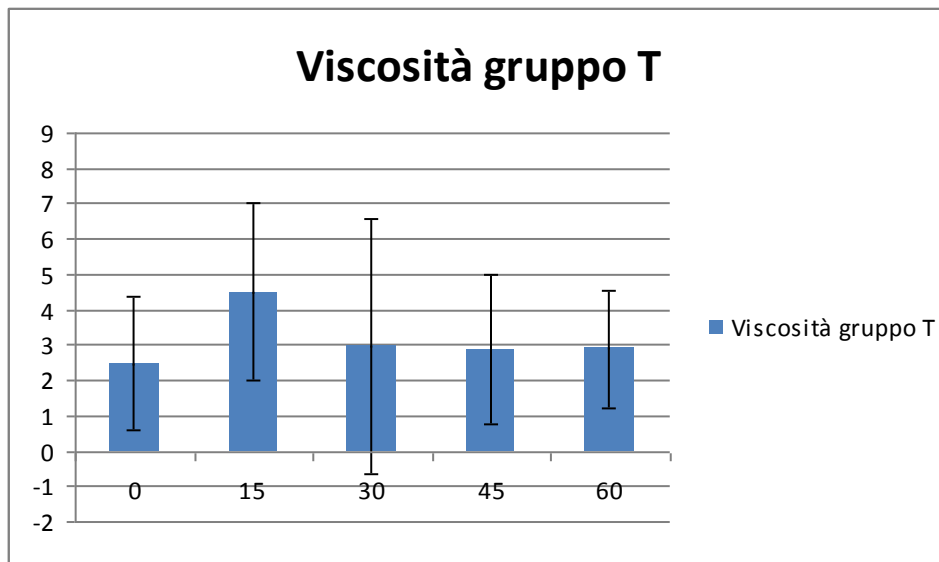
## VISCOSITA'

Questo parametro è stato valutato ad ogni prelievo di liquido sinoviale misurandone il filo in cm. Il parametro viscosità è stato per il gruppo S al tempo T0 della lunghezza media di  $2,2 \pm 1,7$  cm, al tempo 15 di  $3,1 \pm 2,3$  cm, al giorno 30 di  $3,9 \pm 2,9$  cm, al giorno 45 di  $3,25 \pm 2,2$  cm ed al giorno 60 di  $4,5 \pm 2,27$  cm. Graficamente le medie con le relative deviazioni standard sono rappresentate di seguito.

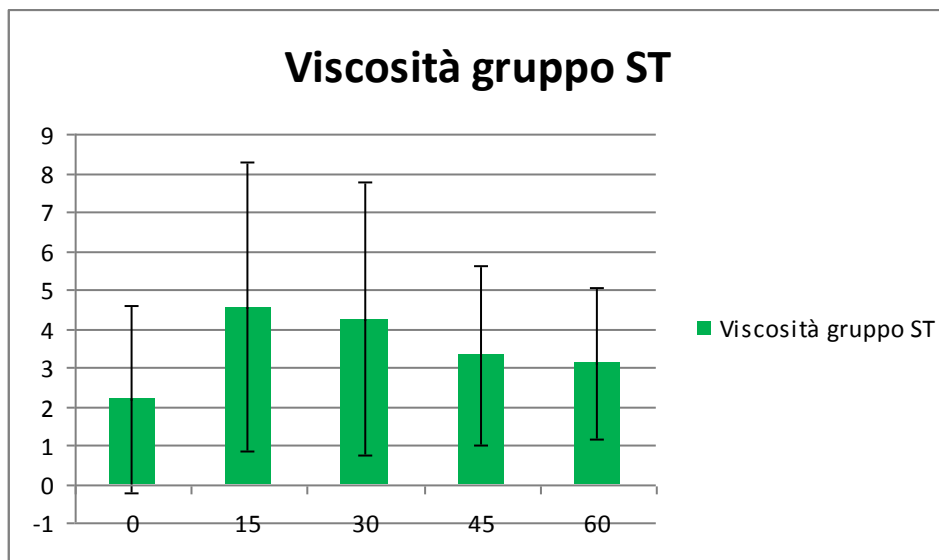


Si può notare la tendenza all'aumento della viscosità del liquido sinoviale dal giorno 0 al giorno 60.

La stessa valutazione è stata fatta per i casi del gruppo T, nei quali la media della viscosità è stata a T0 di  $2,5 \pm 1,9$  cm, a T15 di  $4,5 \pm 2,5$  cm a T30  $2,9 \pm 3,6$  cm, a T45 di  $2,8 \pm 2,1$  cm e al tempo T60 di  $2,8 \pm 1,6$  cm. Il grafico riportato di seguito mostra queste variazioni di viscosità nel tempo di studio. Si può notare un rialzo medio della viscosità al 15 giorno di trattamento, per poi attestarsi su valori medi simili a quello del tempo 0.



Lo stesso è stato fatto per il gruppo ST. La viscosità media è stata di  $2,1 \pm 2,4$  cm al tempo 0, di  $4,5 \pm 3,7$  al tempo 15, di  $4,2 \pm 3,5$  al tempo 30, di  $3,3 \pm 2,3$  al tempo 45, di  $3,1 \pm 1,9$  al tempo 60.



### **QUANTITA' DI LIQUIDO SINOVIALE**

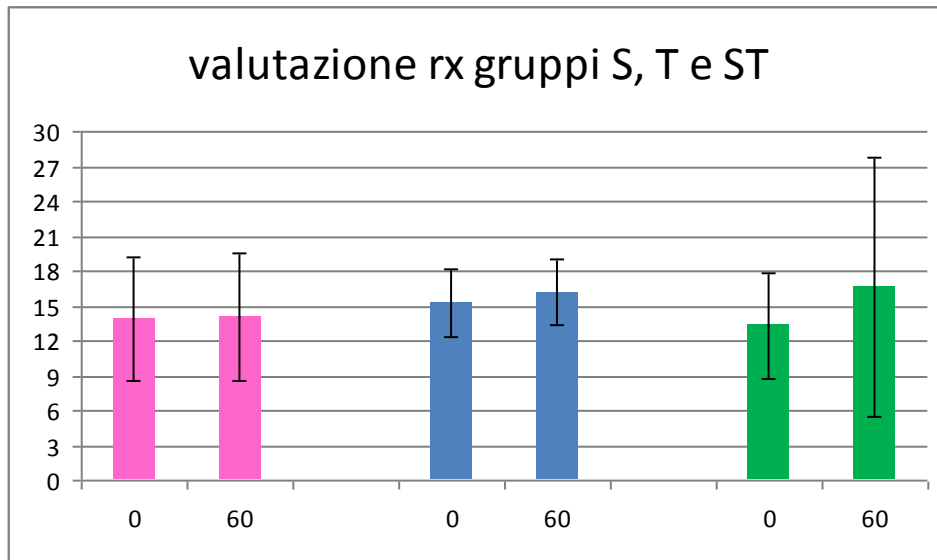
Il liquido sinoviale, quando prelevato, è stato valutato anche nella sua quantità. Ponendo la quantità di 0,5 ml come normale, sono stati attribuiti punteggi di 1 quando diminuito e di 2 quando aumentato. Diminuzione e aumento sono due caratteristiche anomale e quindi sono state associate per fornire delle percentuali relative alle modificazioni della quantità di liquido sinoviale.

I cani appartenenti al gruppo di trattamento S avevano al T0 una percentuale di casi anomali relativamente la quantità di liquido sinoviale pari all'83% . Al termine della terapia i casi con anomalie del liquido sinoviale sono scesi al 76 % della totalità dei casi del gruppo S. Allo stesso modo i cani del gruppo T partivano con l'83% dei casi con liquido sinoviale o abbondante o scarso, e al termine dello studio il numero si è ridotto al 66%.

I pazienti del gruppo ST avevano un 78 % dei casi a T0 con anomale quantità di liquido sinoviale, numero diminuito al termine dello studio con il 64% dei cani che ancora non presentava la giusta quantità di fluido in articolazione.

## VALUTAZIONE RADIOGRAFICA

I punteggi attribuiti allo studio radiografico a T0 e T60 sono stati riportati. Le due radiografie (antero-posteriore e medio-laterale) del gomito hanno costituito un unico punteggio. I 96 valori, suddivisi nei tre gruppi di trattamento, sono stati riportati di seguito

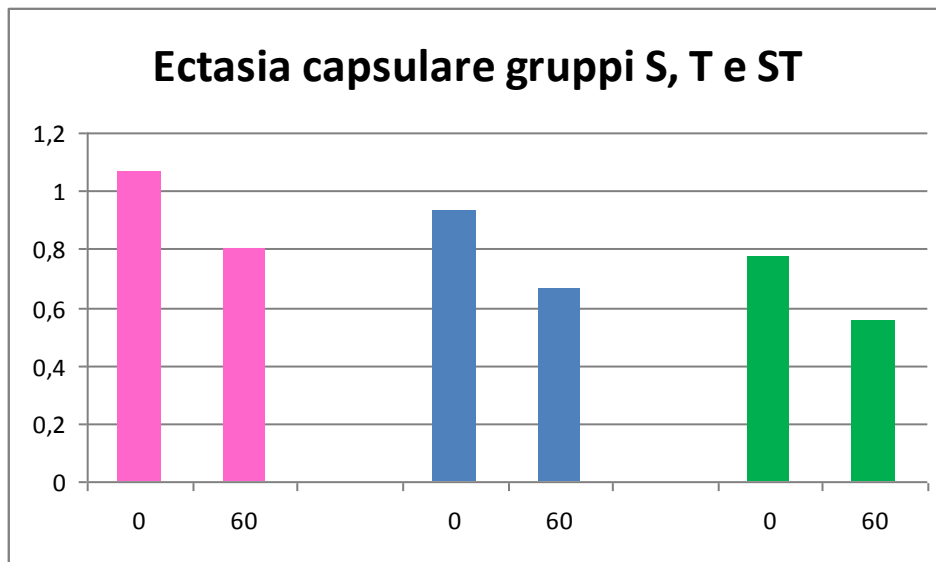


La media delle valutazioni del gruppo S è stata a T0 di  $13,9 \pm 2,3$  punti e a T60 di  $14,1 \pm 5,4$  punti. Il gruppo T ha avuto come media un punteggio di  $15,2 \pm 2,9$  a T0 e un punteggio di  $16,2 \pm 2,8$  punti a T60. Il gruppo ST ha avuto valori medi della valutazione di  $13,3 \pm 4,5$  punti a T0 e di  $16,6 \pm 11,1$  punti a T 60.

## ECTASIA CAPSULARE

L'ectasia capsulare dell'articolazione colpita da OA è stata valutata clinicamente e l'entità riportata tramite punteggio progressivo al crescere della dilatazione dell'articolazione.

Di seguito viene riportato un grafico che riassume l'andamento del punteggio attribuito ai vari gruppi di studio S, T, ed ST al tempo 0 ed al tempo 60.



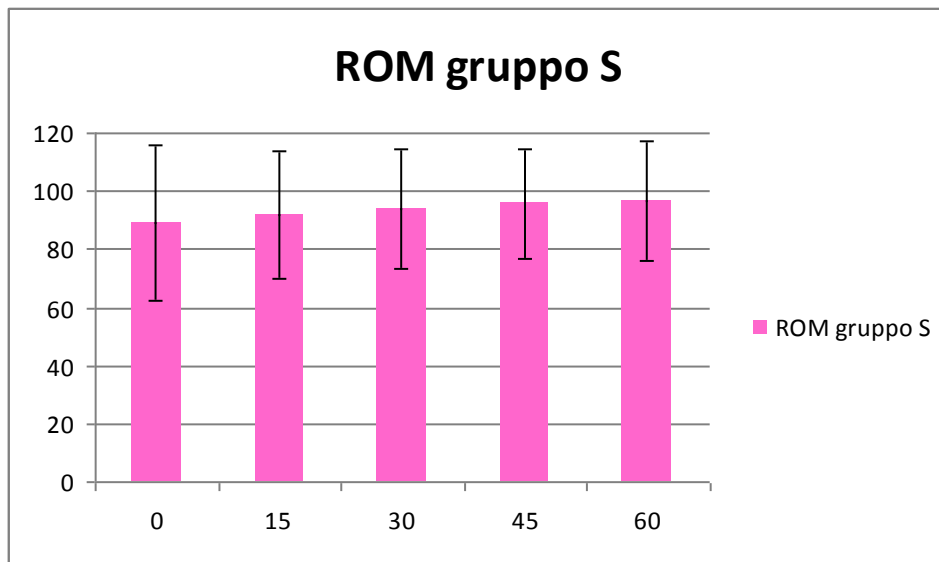
La media delle valutazioni relative all'entità dell'ectasia capsulare è stata per il gruppo S al giorno 0 di  $1,1 \pm 0,5$  punti ed al giorno 60 di  $0,8 \pm 0,7$  punti. Il gruppo T ha ricevuto una valutazione di  $0,9 \pm 0,8$  punti alla prima visita, e a T60 di  $0,6 \pm 0,8$  punti. Il gruppo ST ha invece avuto una valutazione media dell'ectasia capsulare di  $0,7 \pm 0,8$  punti a T0 e di  $0,5 \pm 0,8$  punti a termine della sperimentazione.

## RANGE OF MOTION

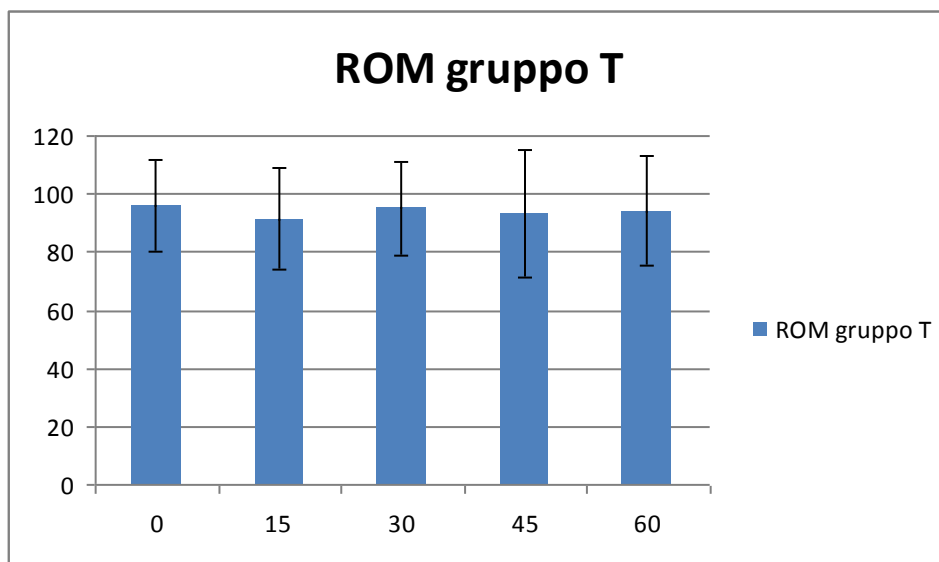
L'escursione di movimento articolare, misurata tramite goniometro come descritto in precedenza, ha fornito un angolo che rappresenta l'escursione complessiva dell'articolazione del gomito.

Il ROM è stato studiato per ogni singolo gruppo di trattamento, misurandone le relative medie numeriche. Il risultato per il gruppo di studio S è stato di  $88,9 \pm 26,8$  gradi al tempo 0 e di  $91,8 \pm 22$  gradi a T15,  $93,8 \pm 20,7$  gradi a T30,  $95,7 \pm 19,1$  gradi a T45 e  $96,6 \pm 20,5$  gradi al termine del trattamento.

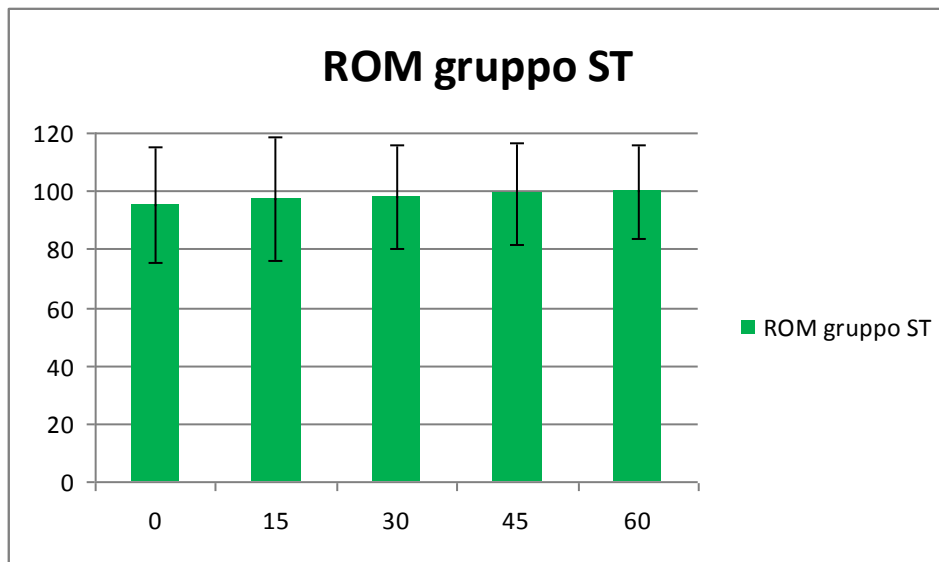




Il gruppo di trattamento T ha invece avuto misure medie di valutazione relative al ROM, a T0 di  $95,9 \pm 15,6$  gradi, a T 15 di  $91,16 \pm 17,4$  gradi, a T30 di  $95,1 \pm 16,1$  gradi , a T 45 di  $93,2 \pm 20,1$  gradi e a T 60 di  $94,2 \pm 19,1$  gradi.



Il gruppo ST ha invece avuto una media delle misurazioni del ROM a T0 di  $95,4 \pm 19,8$  gradi, a T15 di  $97,2 \pm 21,4$  gradi, a T 45 di  $98,4 \pm 17,7$  gradi, a T45 di  $99,1 \pm 17,6$  e al temine della valutazione di  $99,7 \pm 16,3$  gradi. Nel grafico sottostante si può notare la distribuzione numerica descitta.



### **INTENSIFICAZIONE ZOPPIA POST SOMMINISTRAZIONE**

Sono stati riportati nelle cliniche anche dati relativi ad eventuali reazioni avverse ai trattamenti nei tre gruppi di studio. Tra le più importanti reazioni avverse locali, si annovera l'intensificazione temporanea del grado di zoppia.

Nel gruppo S il 66% dei soggetti trattati ha manifestato nelle 24 ore seguenti l'inoculo una intensificazione del grado di zoppia. Nelle successive ore la totalità dei cani ha avuto la spontanea remissione dei sintomi.

Nel gruppo T il 7% dei soggetti trattati ha avuto un intensificazione del grado di zoppia e la totalità di questi ha avuto remissione spontanea della sintomatologia.

Il gruppo ST ha visto un intensificazione della zoppia nel 50% dei casi, con una remissione spontanea del sintomo nelle successive ore alla comparsa.

## STATISTICA INFERENZIALE

---

Un ulteriore studio statistico ha permesso di elaborare i dati in modo da poter valutare l'efficacia dei trattamenti. La validità dei trattamenti nei 3 gruppi di studio è stata appurata nel gruppo singolo, confrontata tra i diversi gruppi di studio e è stato valutato se il trattamento nel campione ha avuto effetto.

Inizialmente è stata valutata l'efficacia del trattamento analizzando le singole voci come se fossero appartenenti ad unico gruppo comprendente i 48 casi trattati.

Le variabili *ROM*, *RX*, e *viscosità* ,sono state sottoposte al test di Shapiro-Wilk con  $p < 0.05$  , il quale ha identificato una distribuzione non normale dei dati. Applicando quindi il test non parametrico di Kruskal-Wallis sono stati analizzati i dati appartenenti ai 3 trattamenti.

I risultati complessivi sono stati per la voce *Zoppia*, *Manovrabilità* e *Quantità di liquido sinoviale* differenti dall'inizio alla fine del trattamento in modo statisticamente significativo, con  $p < 0.01$  per il parametro zoppia,  $p < 0.01$  per il parametro manovrabilità, e  $p = 0,025$  per la Quantità di liquido sinoviale.

Nessuna delle due variabili *RX* e *ROM* differisce significativamente tra giorno 0 e gli altri giorni, con *RX* avente  $p = 0.5435$  (a 0 e 60 giorni) e *ROM* avente  $p = 0.7987$  con una tendenza, evidentemente non significativa ad un aumento dei valori con il passare dei giorni. Il parametro *viscosità* del liquido sinoviale invece ha mostrato un valore di  $p = 0.06773$ . Questa è una tendenza alla significatività interessante. Probabilmente con una casistica più estesa si sarebbe evidenziata una differenza statisticamente significativa dall'inizio alla fine del trattamento.

I singoli trattamenti nei gruppi studio sono stati analizzati invece con il test Chiquadro per le variabili distribuite normalmente, mentre è stato applicato il test di Kruskall Wallis per quelle che non mostravano una distribuzione normale come visto sopra.

### **TRATTAMENTO GRUPPO S**

Il parametro zoppia ha mostrato una differenza significativa tra T0 e T60, con  $p < 0.05$ . Il trattamento nel gruppo S per quello che riguarda il parametro manovrabilità è risultato anch'esso differente dall'inizio alla fine del trattamento, con  $p = 0,05$ . La quantità di liquido sinoviale ha avuto invece un  $p = 0,11$  risultando non dissimile dall'inizio del trattamento.

Le variabili RX, ROM, e viscosità del liquido sinoviale, hanno dato rispettivamente valori di  $p = 0.96$ ,  $p = 0.86$ ,  $p = 0.21$ , risultando non differenti tra l'inizio e la fine del trattamento.

### **TRATTAMENTO GRUPPO T**

Allo stesso modo sono stati applicati il test Chiquadro e Kruskall Wallis per definire le significatività dei valori all'interno del gruppo di trattamento T.

Il valore zoppia è risultato modificarsi in modo significativo con  $p < 0.01$ ; la manovrabilità e la quantità del liquido sinoviale invece sono risultate con valori non significativamente differenti dall'inizio alla fine del trattamento, con  $p = 0.6726$  e  $p = 0.1375$  rispettivamente.

Il test di Kruskall Wallis ha evidenziato per il gruppo T valori di  $p = 0.9825$  per il ROM e di  $p = 0.5642$  per la viscosità del liquido sinoviale, mentre un valore di  $p < 0.05$  per la valutazione RX, ovvero una differenza statisticamente significativa della differenza dei valori tra T0 e T60.

## **GRUPPO DI TRATTAMENTO ST**

Il parametro zoppia ha mostrato una differenza significativa tra T0 e T60, con  $p < 0.05$ . Il trattamento nel gruppo S per quello che riguarda il parametro manovrabilità è risultato anch'esso differente dall'inizio alla fine del trattamento, con  $p < 0.05$ . La quantità di liquido sinoviale ha avuto invece un  $p = 0.91$  risultando non dissimile dall'inizio alla fine del trattamento.

Le variabili RX, ROM, e viscosità del liquido sinoviale, hanno dato rispettivamente valori di  $p = 0.82$ ,  $p = 0.96$ ,  $p = 0.41$ , risultando non differenti tra l'inizio e la fine del trattamento.

In definitiva il parametro zoppia è migliorato in tutti e tre i trattamenti, manovrabilità invece è migliorata nel trattamento del gruppo ST ed S, mentre i punteggi radiografici sono rimasti uguali nei gruppi S e ST, mentre sono aumentati dall'inizio alla fine del trattamento nel gruppo T.

E' stato poi applicato il test di Person's ed il test di Fisher's per valutare se ci fossero differenze statisticamente significative tra i gruppi oggetto di studio al tempo T0, T15, T30, T45, T60.

I test hanno mostrato non esserci differenze al T0 confrontando tra i gruppi tutte le voci analizzate. Ciò a conferma che la randomizzazione è stata eseguita con successo e i soggetti sono stati ben suddivisi tra i tre gruppi di studio.

L'efficacia del trattamento del gruppo S è stata quindi confrontata con l'efficacia degli altri trattamenti in tutte le variabili ed è risultata non essere dissimile agli altri gruppi di trattamento.

Eccezione è stata per il parametro relativo alla manovrabilità, che invece ha manifestato comportamento differente tra i 3 gruppi di studio. Sono risultate differenze statisticamente significative utilizzando il test di Person's tra i tre

gruppi alla valutazione di T60, con  $p < 0.05$  ; in altre parole per questo parametro l'efficacia dei tre trattamenti è risultata diversa.

## **DISCUSSIONI E CONCLUSIONI**

Lo studio ha avuto l'obiettivo primo di valutare l'efficacia clinica dello stanozololo somministrato per via intrarticolare per il trattamento dell'OA di gomito nel cane. La specialità medicinale utilizzata come test è stata il stanozololo® ( 3mg di stanozololo in 0,5 ml sospensione acquosa) , fornito dalla ditta sponsor.

Il trattamento con corticosteroidi sistemici per trattare l'OA va usato con cautela a causa degli effetti collaterali che insorgono dopo somministrazioni per relativamente lunghi periodi (Carlos 2007). Usare corticosteroidi locali tramite infiltrazione intrarticolare si è visto avere una potente azione anti-infiammatoria nei confronti dei sinoviociti, ma una simultanea inibizione della produzione di proteine della matrice cartilaginea da parte dei condrociti (Hamilton et al, 1981).

In letteratura, a tutt'oggi sono descritti i FANS come trattamento più comunemente utilizzato per la terapia dell'OA del cane (Pinna et al, 2013; Sanders et al, 2009). Esistono molte molecole di antinfiammatori non steroidei tra cui il mavacoxib (Coxe et al, 2011). Quest'ultimo è commercializzato come Trocoxil®. L'efficacia di tale farmaco nell'alleviare i sintomi riferibili ad OA è documentata (Vilar, 2012; Emmerich, 2009).

La sua azione "ritardo" ha consentito di utilizzarlo come trattamento nel gruppo di controllo per lo studio oggetto di questo elaborato.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'efficacia dello stanozololo sull'OA del gomito di cani trattati, e la procedura avrebbe idealmente previsto uno studio in cieco con un gruppo S testato verso un gruppo di trattamento

placebo. A causa del forte dolore generato dall'OA di gomito dei cani non trattati, eticamente non sarebbe stato corretto.

Lo studio è stato quindi eseguito su tre gruppi di pazienti, a cui è stata somministrata una terapia nei confronti dell'OA. Si è quindi suddiviso il campione in un gruppo test, trattato con stanozololo intrarticolare, un gruppo di controllo trattato con mavacoxib (prodotto autorizzato Trocoxil) indicato per il trattamento dell'OA, e somministrabile per os, ed un gruppo trattato con entrambi i farmaci.

In questo modo l'eticità dello studio è stata soddisfatta.

Lo stanozololo è uno steroide di sintesi derivato dal testosterone. Una delle sue caratteristiche è quella di avere un rapporto estremamente favorevole, se paragonato con gli altri steroidi, tra gli effetti anabolizzanti e quelli androgenici (Zanetti, 2004). Altra sua peculiarità è la probabile affinità di legame con i recettori per i glucorticoidi, da cui ne deriva il suo potente effetto anti-infiammatorio locale. La molecola in oggetto ha inoltre la capacità di indurre la sintesi di trofici da parte dei tessuti articolari ( in particolare l'insulina like growth factor 1), un' azione fibrinolitica, un azione catabolica sul metabolismo delle cellule sinoviocitiche, condrocitiche e osteoblastiche, con conseguente riduzione del tempo di mitosi delle stesse. L'azione dello stanozololo in ambiente intrarticolare incrementa la produzione del collagene che compone la matrice cellulare, e favorisce la mineralizzazione dell'osso sub-condrale ( Saleri et al, 2004; Liao et al, 2003; Zhonghua et al, 2009; Beneton et al, 1991).

L'uso intrarticolare dello stanozololo è già assodato nella terapia degli stati osteoartrosici del cavallo, e prove sperimentali su modelli ovini ne hanno comprovato la sua efficacia, esplicando tutte azioni sopra descritte (Spadari et al, 2013).

In letteratura non sono ancora descritti trattamenti per l'OA nel cane con stanozololo intrarticolare. Per contro il metabolismo di tale molecola nella specie

canina, equina ed umana è ben conosciuto, anche per l'abuso di tale sostanza ( Yamada et al, 2008; Stewart et al, 2009).

Gli effetti attesi, riscontrabili con miglioramento delle condizioni cliniche dei soggetti trattati, sono stati oggettivati dall'elaborazione statistica dei dati raccolti durante la sperimentazione.

I gruppi di studio sono stati 3: il primo (gruppo test S) composto da 15 casi, il secondo (gruppo controllo T) composto da 15 casi, ed il terzo (gruppo ST) composto da 18 casi.

Il campione era costituito da cani appartenenti a molte razze con una netta prevalenza di Labrador, che da soli hanno rappresentato il 48% dell'intero campione. Il peso medio dei cani trattati era di 33 kg, mentre l'età media era di circa 7 anni. Le artropatie di gomito erano per lo più di origine displasica, ma non sono mancate OA di gomito di probabile natura traumatica. Tutti i casi arruolati al momento della visita avevano una zoppia di 2° o 3°, derivante dall'OA.

La zoppia, più o meno grave era il più delle volte di tipo cronico, e nel 96% dei casi già trattata in precedenza con farmaci antinfiammatori non steroidei o con infiltrazioni articolari di corticosteroidi o GAG .

La randomizzazione fatta per attribuire il trattamento al momento della reclutazione ha dato una distribuzione dei casi omogenea, e questo è stato confermato dalla mancata differenza statisticamente significativa al tempo 0 tra i tre gruppi di trattamento per tutte le voci prese in esame.

La zoppia è senza dubbio l'esito di una disfunzione articolare, sia essa di tipo meccanico che di tipo algico. La claudicazione del proprio animale è stata anche il movente principale che ha condotto il proprietario in visita. Per questo motivo, un miglioramento di almeno un grado di zoppia viene considerato nel presente studio come successo terapeutico.



Per questo parametro sono state considerate sia la mediana, così da poter esprimere al meglio il numero di soggetti aventi quel determinato grado di zoppia nei diversi tempi di visita, sia la media, che meglio rappresenta graficamente l'andamento delle curve nel tempo. In particolare i casi con zoppia di 2° e 3° al tempo 0 erano 18, e al tempo T60 sono diminuiti a 2 (aventi zoppia di 2°). In altre parole più dell'80% dei casi trattati con stanozololo hanno avuto un miglioramento di almeno un grado di zoppia, e almeno il 40% dei soggetti ha avuto un miglioramento di due gradi di zoppia, questo nonostante l'intensificarsi del sintomo nelle ore successive la somministrazione intrarticolare. L'intensificarsi della zoppia ha avuto remissione spontanea nelle 24 ore successive alla comparsa, nella totalità dei soggetti. L'iniziale infiammazione articolare è spiegabile con la catena degli eventi scatenati dallo stanozololo entrato in articolazione. Probabilmente la sostanza inoculata ad alto peso molecolare induce un'iniziale infiammazione, che termina nelle immediate ore successive, potendo mettere in mostra gli effetti terapeutici.

Il parametro ha avuto un andamento simile nel gruppo di controllo dove l'efficacia terapeutica è già stata confermata in altri studi. Il parametro in esame nel gruppo ST che ha ricevuto entrambe le terapie, si è comportato anch'esso in linea con quanto avvenuto nel gruppo S. Tra i tre diversi gruppi non sono emerse differenze significative per  $p < 0,05$ , e questo conferma l'efficacia del trattamento con stanozololo intrarticolare. Dall'analisi fatta nel presente studio stanozololo, utilizzato come unica terapia, o in associazione con mavacoxib per os, è quindi in grado di ridurre di almeno un grado di zoppia cani affetti da OA di gomito.

La risposta alle manipolazioni passive dell'articolazione è un parametro che può indicare, assieme all'ectasia capsulare, l'entità del fenomeno flogistico che spesso accompagna l'OA di gomito. Manovrare un gomito infiammato significa indurre stimolazioni algiche generanti risposta clinicamente valutabile. I punteggi attribuiti a seconda dell'entità della risposta dell'animale sono stati valutati e si è visto che si sono modificati in positivo per tutti e tre i gruppi in studio per  $p < 0,05$ .

, ma l'entità del miglioramento è stata dissimile tra i tre gruppi. Prendendo in considerazione il tempo T60, ovvero l'ultima visita di controllo il test di Person's ha evidenziato un miglioramento statisticamente significativo per  $p < 0,05$  più alto nei gruppi S ed ST rispetto che nel gruppo T. La risposta di tale modifica la si può ricercare negli effetti dello stanozololo ( presente in entrambi i gruppi che hanno avuto un migliore risultato). La molecola probabilmente associa gli effetti antinfiammatori dovuti all'affinità per i recettori glucocorticoidi, agli effetti anabolizzanti a lungo termine sulle cellule dell'ambiente articolare. L'aumento di produzione di collagene, il mantenimento dell'omeostasi ormonale articolare e l'attivazione degli osteoblasti a riparare il danno subcondrale, potrebbero spiegare il miglioramento clinico nei primi giorni post-inoculo e il mantenimento di quest'ultimo nel tempo per l'attivazione dei processi anabolici cellulari.

In definitiva l'analisi statistica per il parametro manipolazione ha mostrato un miglioramento del valore in tutti e tre i gruppi dall'inizio alla fine del trattamento, con un risultato maggiore nei gruppi trattati con Stanozololo.

Il grado di ectasia capsulare, contrariamente a quanto atteso, ha mostrato un miglioramento significativo per  $p < 0,05$  durante la durata del trattamento, ma senza differire tra i gruppi. I tre trattamenti sono stati ugualmente efficaci nel ridurre il grado di ectasia capsulare.

La mobilità articolare è il risultato della biomeccanica di gomito, dell'eventuale impedimento da parte di strutture articolari dure come gli osteofiti o molli come la sinoviale, e dalla componente algica che modula il movimento stesso.

Il ROM nel gruppo test non ha mostrato differenze dall'inizio alla fine del trattamento, come non ci sono state differenze significative negli altri gruppi ST e T. Probabilmente questo parametro necessita di un tempo maggiore di 2 mesi per subire delle modificazioni misurabili.

La misurazione dei punteggi radiografici ha mostrato delle interessanti differenze tra i gruppi in studio. I punteggi se crescenti rispecchiano un aumento delle

osteofitosi e sclerosi subcondrale. L'analisi statistica non ha evidenziato delle differenze tra inizio e fine trattamento tra i punteggi radiografici del gruppo test e gruppo ST, per  $p < 0,05$ , ma per il gruppo T l'analisi statistica ha mostrato una tendenza alla significatività con  $p < 0,056$ . Probabilmente con un campione più grande il dato sarebbe risultato differente da inizio e fine trattamento, ovvero il punteggio radiografico medio a inizio trattamento di 15 e a fine di 16,2 punti per il gruppo T, avrebbe significato un aumento della progressione artrosica. Tale evento non è emerso invece per i gruppi trattati con stanozololo.

I cambiamenti radiografici in corso di OA sono spesso osservabili a distanza di 30 giorni. Dopo 60 giorni è possibile affermare che, se non vi sono evidenze statistiche di modificazione dei punteggi radiografici, la progressione artrosica è stata rallentata. Detto ciò si può attribuire allo stanozololo intrarticolare la capacità di ritardare l'evoluzione della progressione osteoartrosica.

Gli ultimi due parametri esaminati hanno riguardato la viscosità del liquido sinoviale e la quantità di quest'ultimo.

Sono due parametri solitamente inversamente proporzionali. La viscosità per i gruppi trattati con stanozololo ha avuto un andamento graficamente crescente, se confrontato con la viscosità dei casi appartenenti al gruppo T, con picchi ai giorni 15 e 30. Queste differenze tra le medie dei valori non sono però state confermate dall'analisi statistica, la quale non ha riscontrato differenze significative tra i tre gruppi di studio. La probabile causa è ancora da ricercarsi nella pochezza del campione, che se pur numericamente alto (48 casi clinici esaminati) è matematicamente piccolo.

La quantità di liquido sinoviale ha visto una tendenza alla normalizzazione in tutti e tre i gruppi trattati, cioè gli esaminatori hanno mediamente raccolto una giusta quantità di liquido sinoviale dalle articolazioni man mano che ci si avvicinava al termine della sperimentazione. Statisticamente anch'essa ha subito il prezzo della pochezza della casistica. Gli sperimentatori non sempre sono riusciti a prelevare il liquido sinoviale, e di conseguenza i campioni esaminabili sono

risultati inferiori dei casi trattati. L'analisi statistica non ha mostrato differenze significative dall'inizio alla fine del trattamento per tutti e tre i gruppi di studio, per i parametri relativi a quantità e viscosità del liquido sinoviale.

In definitiva si può concludere che lo stanozololo per via intrarticolare riesce a migliorare positivamente il quadro clinico dell'OA di gomito del cane, sia come unica terapia che in associazione con mavacoxib.

L'azione terapeutica dello stanozololo sembra migliorare la progressione osteoartrosica del cane, ritardando l'evoluzione dei segni radiografici e migliorando lo stato generale dell'articolazione del gomito. La migliorata capacità rigenerativa e riparativa di condrociti e osteoblasti, unita ad un'azione anti-infiammatoria locale ha portato ad un miglioramento clinico significativo.

La configurazione stabile dello stanozololo in ambiente intrarticolare inoltre ha probabilmente favorito l'omeostasi ormonale, riequilibrando il rapporto tra androgeni ed estrogeni responsabili dell'infiammazione. L'eliminazione di uno dei fattori flogistici ha sicuramente ritardato la progressione osteoartrosica, osservabile clinicamente con i miglioramenti dei parametri in esame e la non modificazione dell'immagine radiografica a distanza di due mesi dall'inizio del trattamento. Probabilmente gli effetti terapeutici del farmaco sono valutabili anche per periodi più lunghi di quelli oggetto di studio.

## BIBLIOGRAFIA

Adamama-Moraitou, K.K., Pardali, D., Athanasiou, L.V., Prassinos, N.N., Kritsepi, M., Rallis, T.S., 2009. Conservative management of canine tracheal collapse with stanozolol: a double blinded, placebo control clinical trial. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 24, 111–118.

Aigner, T., Zien, A., Gehrsitz, A., Gebhard, P.M., Mckenna, L., 2001. Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology. *Arthritis and Rheumatism* 44, 2777–2789.

Alsalameh, S., Mollenhauer, J., Hain, N., Stock, K.P., Kalden, J.R., Burmester, G.R., 1990. Cellular immune response toward human articular chondrocytes. T cell reactivities against chondrocyte and fibroblast membranes in destructive joint diseases. *Arthritis and Rheumatism* 33, 1477–1486.

Amstrong, S., Read, R., Gosh, P., 1994. The effects of intraarticular hyaluronan on cartilage and subchondral bone changes in a ovine model of early osteoarthritis. *Journal of Rheumatology* 21, 680–688.

Appelboom, T., Schuermans, J., Verbruggen, G., Henrotin, Y., Reginster, J.Y., 2001. Symptoms modifying effect of avocado/ soybean unsaponifiables (Asu) in knee osteoarthritis. A double blind, prospective, prodotto di controllo-controlled study. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 30, 242–247.

Aszodi A. JF Bateman, E Gustafsson, 2000. Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: what can we learn from knockout mice?. *Cell Struct Funct* 25, 73.

Attur, M.G., Dave, M., Akamatsu, M., Katoh, M., Amin, A.R., 2002. Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. *Osteoarthritis and Cartilage* 10, 1–4.

Barone R., 2004. Articolazioni della cintura e dell'arto toracici in Barone, *Anatomia comparata dei mammiferi domestici*, vol 2°(parte I) artrologia, 3th edition, Edagricole editore, Bologna: pp.101-230.

Barone R., 2004. Caratteri generali delle articolazioni in Barone, *Anatomia comparata dei mammiferi domestici*, vol 2°(parte I) artrologia, 3th edition, Edagricole editore, Bologna, pp. 10-23.

Bassleer, C., Rovati, L., Franchimont, P., 1998. Stimulation of proteoglycan production by glucosamine sulphate in chondrocytes isolated from human osteoarthritic articular cartilage in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage* 6, 427–434.

Bee, A Barnes, MD Jones, DHL Robertson, 2000. Canine TIMP-2: purification, characterization and molecular detection. *The veterinary Journal*. 160, 126.

Belch, J.J.F., Madhok, R., McArdle, B., et al., 1986. The effect of increasing fibrinolysis in patients with rheumatoid arthritis: a double blind study of stanozolol. *Quarterly Journal of Medicine* 58, 19–27.

Beneton MN, Yates AJ, Rogers S., McCloskey EV, Kanis JA, 1991. Stanozolol stimulates remodelling of trabecular bone and net formation of bone at the endocortical surface. *Clin Sci (Lond)*; 81: 543-9.

Bierer, T.L., Bui, L.M., 2002. Improvement of arthritic signs in dogs fed green-lipped mussel (*Perna canaliculus*). *Journal of Nutrition* 132, 1634S–1636.

Blanco, F.J., Ochs, R.L., Schwarz, H., Lotz, M., 1995. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *American Journal of Pathology* 146, 75–85.

Blaschke U.K., EF Eikenberry, DJS Hulmes, 2000. Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. *Journal Biol. Chem.* 275, 10370.

Bluteau, G., Conrozier, T., Mathieu, P., Vignon, E., Herbage, D., Mallein-Gerin, F., 2001. Matrix metalloproteinase-1, -3, -13 and aggrecanase-1 and-2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis. *Biochimica Biophysica Acta* 1526, 147–158.

Bobinac, D., Spanjol, J., Zoricic, S., Maric, I., 2003. Changes in articular cartilage and subchondral bone histomorphometry in osteoarthritic knee joints in humans. *Bone* 32, 284–290.

Borghetti P., Martini F.M., 2002. Sistema locomotore: articolazioni in Marcato, *Patologia sistematica veterinaria*, Edagricole Editore, Bologna, pp.1197-1233.

Boumediene, K., Conrozier, T., Mathieu, P., Richard, M., Marcelli, E., Vignon, E., Pujol, J.P., 1998. Decrease of cartilage transforming growth factor-beta receptor II expression in the rabbit experimental osteoarthritis – potential role in cartilage breakdown. *Osteoarthritis and Cartilage* 6, 146–149.

Boumediene, K., Felisaz, N., Bogdanowicz, P., Galera, P., Guillou, J.P., Pujol, J.P., 1999. Avocado/soya unsaponifiables enhance the expression of transforming growth factor beta1 and beta2 in cultured articular chondrocytes. *Arthritis and Rheumatism* 42, 148–156.

Brama P.A., JM Tekoppele, RA Bank, 2000. Functional adaptation of equine articular cartilage: the formation of regional biochemical characteristics up to age one year. *Equine vet journal* 32, 217.

Brandt, K.D., Smith, G., Kang, S.Y., Myers, S., O'Connell, B., Albrecht, M., 1997. Effects of diacerhein in an accelerated canine model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 5, 438–449.

Braunstein, E.M., Brandt, K.D., Albrecht, M., 1990. MRI demonstration of hypertrophic articular cartilage repair in osteoarthritis. *Skeletal Radiology* 19, 335–339.

Buckwalter, J.A, LC Rosenberg, LH Tang, 1984. The effect of link protein on proteoglycan aggregate structure. An electron microscopic study of the molecular architecture and dimensions of proteoglycan aggregates. *Journal of Biological Chemistry*. 259, 5361-5362.

Budsberg, S.C., Johnston, S.A., Schwarz, P.D., Decamp, C.E., Claxton, R., 1999. Efficacy of etodolac for the treatment of osteoarthritis of the hip joints in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 214, 206–210.

Carlson, C.S., Loeser, R.F., Jayo, M.J., Weaver, D.S., Adams, M.R., Jerome, C.P., 1994. Osteoarthritis in cynomolgus macaques: a primate model of naturally occurring disease. *Journal of Orthopaedic Research* 12, 331–339.

Carlson, C.S., Loeser, R.F., Purser, C.B., Gardin, J.F., Jerome, C.P., 1996. Osteoarthritis in cynomolgus macaques. III: effects of age, gender, and subchondral bone thickness on the severity of disease. *Journal of Bone and Mineral Research* 11, 1209–1217.

Carney, S.L., 1996. Effect of diacetyl rhein on the development of experimental osteoarthritis. A biochemical investigation. *Osteoarthritis and Cartilage* 4, 251–261.

Carter SD, A Barnes, WH Gilmore, 1999. Canine rheumatoid arthritis and inflammatory cytokines *Veterinary immunology and immunopathology*. 69, 201-203.

Cheung, H.S., Halverson, P.B., Mccarty, D.J., 1983. Phagocytosis of hydroxyapatite or calcium pyrophosphate dihydrate crystals by rabbit articular chondrocytes stimulates release of collagenase, neutral protease, and



prostaglandins E2 and F2 alpha. Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine 173, 181– 189.

Clements, K.M., Price, J.S., Chambers, M.G., Visco, D.M., Poole, R.M., Mason, R.M., 2003. Gene deletion of either interleukin- 1beta, interleukin- 1beta-converting enzyme, inducible nitric oxide synthase, or stromelysin 1 accelerates the development of knee osteoarthritis in mice after surgical transection of the medial collateral ligament and partial medial meniscectomy. Arthritis and Rheumatism 48, 3452–3463.

Coggon, D., Reading, I., Croft, P., McLauren, M., Barrett, D., Cooper, C., 2001. Knee osteoarthritis and obesity. International Journal of Obesity 25, 622–627.

Conrozier, T., Mathieu, P., Piperno, M., Richard, S., Annefeld, M., Richard, M., Vignon, E., 1998. Glucosamine sulphate significantly reduced cartilage destruction in a rabbit model of osteoarthritis. Arthritis and Rheumatism 41S, 147.

Conte, A., Volpi, N., Palmieri, L., Bahous, I., Ronca, G., 1995. Biochemical and pharmacokinetic aspects of oral treatment with chondroitin sulphate. Arzneimittelforschung 45, 918–925.

Corley, E.A., 1992. Role of the Orthopedic Foundation for Animals in the control of canine hip dysplasia. Veterinary Clinical of North America of Small Animal Practitioners 22, 579–593.

Cox S.R., Lesman S.P., Boucher J.F., Krautmann M.J., Hummel B.D., Savides M., Marsh S., Fielder A., Stegemann M.R., 2010. The pharmacokinetics of mavacoxib, a long-acting COX-2 inhibitor, in young adult laboratory dogs. J Vet Pharmacol Ther, 33(5):461-70.

Cox SR , Liao S, Payne-Johnson M, Zielinski RJ, Stegemann MR., 2011. Population pharmacokinetics of mavacoxib in osteoarthritic dogs. J Vet Pharmacol Ther. 34, (1), 1-11.

Dassler C.L., Vasseur P.B., 2003. Elbow luxation in Slatter's Textbook of Small animal surgery, Vol II, 3rd edition, Elsevier Saunders, Philadelphia: pp.1919-1927.

De Leval, X., Delarge, J., Somers, F., De Tullio, P., Henrotin, Y., Pirotte, B., Dogne, J.M., 2000. Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition. Current Medical Chemistry 7, 1041–1062.

Dedrick, D.K., Goldstein, S.A., Brandt, K.D., O'Connor, B.L., Goulet, R.W., Albrecht, M., 1993. A longitudinal study of subchondral plate and trabecular bone in cruciate-deficient dogs with osteoarthritis followed up for 54 months. Arthritis and Rheumatism 36, 1460–1467.

Dodge, G.R., Jimenez, S.A., 2003. Glucosamine sulphate modulates the levels of aggrecan and matrix metalloproteinase-3 synthesized by cultured human osteoarthritis articular chondrocytes. Osteoarthritis and Cartilage 11, 424–432.

Dondi, M., Saleri, R., Bianchi, E., Pedrazzi, G., Zannetti, G., 2002. Il collasso tracheale del cane: un nuovo approccio terapeutico. Veterinaria 1, 61–67.

Edwards RH, Dworzak F, Gerber RP., 1984. Stanazolol in patients with muscular dystrophy increases muscle protein synthesis measured in vivo with stable isotopes. Brit J Clin Pharm;19: 124-125.

Ellis AJ, Cawston TE and Mackie EJ., 1994. The differential effects of stanozolol on human skin and synovial fibroblasts in vitro: DNA synthesis and receptor binding. Agents Actions 41: 37-43.

Ellis, A.J., Cawson, T.E., Mackie, E.J., 1994. The different effects of stanozolol on human skin and synovial fibroblast in vitro: DNA synthesis and receptor binding. Agents and Actions 41, 37–43.

Emmerich I.U., 2009. Neue Arzneimittel für Kleintiere. Schattauer 2010, Tierärztliche Praxis Kleintiere 5/2010, 300-312.

Eurell J.A., Van Sickle D.C., 2000. Tessuti connettivi e di sostegno in Dellman, Anatomia microscopica veterinaria, 2nd edition, Casa editrice Ambrosiana Editore, Milano : pp. 42-77.

Evans H.E., 1993. The skeleton in Evans, Miller's Anatomy of the dog. 4th edition, Saunders company editore, Pennsylvania, 122-218.

Evans H.E., de Lahunta A., 2013. Arthrology in Evans, Miller's anatomy of the dog, 4th edition, Elsevier Saunders editore, St. Luis, Missouri, 158-184.

Everts B, P Währborg, T Hedner 2000. COX-2-Specific inhibitors—the emergence of a new class of analgesic and anti-inflammatory drugs. Clinical rheumatology. 19,331-334.

Falanga, V., Greenberg, A.S., Zhou, L., Ochoa, S.M., Roberts, A.B., Falabella, A., Yamaguchi, Y., 1998. Stimulation of collagen synthesis by the anabolic steroid stanozolol. Journal of Investigation Dermatology 111, 1193–1197.

Farndale, R.W., Buttle, D.J., Barrett, A.J., 1986. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. Biochimica et Biophysica Acta 883, 173–177.

Farndale, R.W., Sayers, C.A., Barrett, A.J., 1982. A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. Connective Tissue Research 9, 247–248.

Farquhar T, J Bertram, RJ Todhunter. 1997. Variations in composition of cartilage from the shoulder joints of young adult dogs at risk for developing canine hip dysplasia. Journal of the American Veterinary Medical Association. 210,1417-1419.

Felisaz, N., Boumediene, K., Ghayor, C., Herrouin, J.F., Bogdanowicz, P., Galerra, P., Pujol, J.P., 1999. Stimulating effect of diacerhein on TGFbeta1 and beta2 expression in articular chondrocytes cultured with and without interleukin-1. Osteoarthritis and Cartilage 7, 255–264.

Fernandez, L., Chirino, R., Boada, L.D., Navarro, D., Cabrera, N., del Rio, I., Diaz-Chico, B.N., 1994. Stanozolol and danazol, unlike natural androgens, interact with low affinity glucocorticoid-binding sites from male rat live microsomes. *Endocrinology* 134, 1401–1408.

Fox, S.M., Burbidge, H.M., Bray, J.C., Guerin, S.R., 1996. Ununited anconeal process: lag-screw fixation. *Journal of American Animal Hospital Association* 32, 52–56.

Frisbie D.D., McIlwraith C.W., Kawcak C.E., Werpy N.M., 2013. Evaluation of intra-articular hyaluronan, sodium chondroitin sulphate and N-acetyl-D-glucosamine combination versus saline (0.9% NaCl) for osteoarthritis using an equine model. *The Veterinary Journal* 197, 824–829.

Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., McIlwraith, C.W., 2009. Evaluation of the effect extracorporeal shock wave treatment on experimentally induced osteoarthritis in middle carpal joints in horse. *American Journal of Veterinary Research* 70, 449–453.

Gannon, J.R., 1998. Clinical experiences with intravenous use of sodium hyaluronate in racing greyhounds. *Australian Veterinary Journal* 76, 474–475.

Garnero P, JC Rousseau, PD Delmas, 2000. Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases. *Arthritis & Rheumatism*. 43, 953-957.

Ghosh, P., 1999. The pathobiology of osteoarthritis and the rationale for the use of pentosan polysulphate for its treatment. *Seminar in Arthritis and Rheumatism* 28, 211–267.

Gingerich, D.A., Strobel, J.D., 2003. Use of client-specific outcome measures to assess treatment effects in geriatric, arthritic dogs: controlled clinical evaluation of a nutraceutical. *Veterinary Therapy* 4, 56–66.

Goldberg R.L., Toole B.P., 1997. Hyaluronate inhibition of cell proliferation. *Arthritis and Rheumatology*. 30, 769-770.

Goldenberg, D.L., Egan, M.S., Cohen, A.S., 1982. Inflammatory synovitis in degenerative joint disease. *Journal of Rheumatology* 9, 204–209.

Goldring M.B., Tsuchimochi K., Ijiri K., 2006. The control of chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry* 97, 33-44.

Goodrich, L.R., Nixon, A.J., 2006. Medical treatment of osteoarthritis in the horse – a review. *Veterinary Journal* 171, 51–69.

Griffon D.J., 2012. Surgical disease of the elbow in Tobias, *Veterinary surgery:small animal*. Elsevier Saunders Editore, St.Luis, Missouri; 725-759.

Guerassimov, A., Zhang, Y., Cartman, A., Rosenberg, L.C., Esdaile, J., Fitzcharles, M.A., Poole, A.R., 1999. Immune responses to cartilage link protein and the G1 domain of proteoglycan aggrecan in patients with osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 42, 527–533.

Guilak, F., Ratcliffe, A., Lane, N., Rosenwasser, M. P. and Mow, V. C., 1994. Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. *J. Orthop. Res.*, 12: 474–484.

Guthrie, S., 1989. Some radiographic and clinical aspects of ununited anconeal process. *Veterinary Record* 124, 661–662.

Hamilton J.A., J Slywka - *The Journal of Immunology*, 1981. Stimulation of human synovial fibroblast plasminogen activator production by mononuclear cell supernatants. *Am Assoc Immnol.* 24, 1296-1298.

Hannon, R.L., Smith, J.G., Cullis-Hill, D., Ghosh, P., Cawdery, M.J., 2003. Safety of Cartrophen Vet in the dog: review of adverse reaction reports in the UK. *Journal of Small Animal Practice* 44, 202–208.

Hartz, A.J., Fischer, M.E., Bril, G., Kelber, S., Rupley, D., Oken, B., Rimm, A.A., 1986. The association of obesity with joint pain and osteoarthritis in HANES data. *Journal Chronic Diseases* 39, 310– 311.

Hegemann N., Kohn B., Brunnberg L. and M. F. Schmidt, 2002. Biomarkers of joint tissue metabolism in canine osteoarthritic and arthritic joint disorders. *Osteoarthritis and Cartilage* 10, 714–721.

Hegemann, N., Kohn, B., Brunnberg, L., Schmidt, M.F., 2002. Biomarkers of joint tissue metabolism in canine osteoarthritic and arthritic joint disorders. *Osteoarthritis and Cartilage* 10, 714–721.

Henrotin, Y., Sanchez, C., Reginster, J.Y., 2002. The inhibition of metalloproteinases to treat osteoarthritis: reality and new perspectives. *Expert Opinion in Therapeutic Patents* 12, 29–43.

Henrotin, Y.E., Bruckner, P., Pujol, J.P., 2003a. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 11, 747–755.

Henrotin, Y.E., Sanchez, C., Deberg, M.A., Piccardi, N., Guillou, P., Msika, P., Reginster, J.Y., 2003b. Avocado/soybean unsaponifiables increase aggrecan synthesis and reduce catabolic and proinflammatory mediator production by human osteoarthritic chondrocytes. *Journal of Rheumatology* 30, 1825–1834.

Hilal, G., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Duval, N., Lajeunesse, D., 1999. Abnormal regulation of urokinase plasminogen activator by insulin-like growth factor 1 in human osteoarthritic subchondral osteoblasts. *Arthritis and Rheumatism* 42, 2112–2122.

Hilal, G., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Ranger, P., Lajeunesse, D., 1998. Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis and Rheumatism* 41, 891–899.

Hilal, G., Massicotte, F., Martel-Pelletier, J., Fernandes, J.C., Pelletier, J.P., Lajeunesse, D., 2001. Endogenous prostaglandin E2 and insulin-like growth factor 1 can modulate the levels of parathyroid hormone receptor in human osteoarthritic osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research* 16, 713–721.

Hills B.A. 2000. Boundary Lubrication in vivo. *Proc. Inst. Mech Eng*, 214, 83-86.

Hua, J., Sakamoto, K., Nagaoka, I., 2002. Inhibitory actions of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on the functions of neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 71, 632– 640.

Hunziker E. B., 2001. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage*, 10, 432–463.

Hurley C.R., Hammer D.L., Shott S., 2007. Progression of radiographic evidence of osteoarthritis following tibial plateau leveling osteotomy in dogs with cranial cruciate ligament rupture: 295 cases (2001–2005): *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 230:1674–1679.

Hwa, S.Y., Burkhardt, D., Little, C., Ghosh, P., 2001. The effects of orally administered diacerein on cartilage and subchondral bone in an ovine model of osteoarthritis. *Journal of Rheumatology* 28, 825–833.

Imhof, H., Breitenseher, M., Kainberger, F., Rand, T., Trattnig, S., 1999. Importance of subchondral bone to articular cartilage in health and disease. *Topics in Magnetic Resonance Imaging* 10, 180–192.

Innes, J.F., Barr, A.R., Sharif, M., 2000. Efficacy of oral calcium pentosan polysulphate for the treatment of osteoarthritis of the canine stifle joint secondary to cranial cruciate ligament deficiency. *Veterinary Record* 146, 433–437.

Jauernig, S., Schweighauser, A., Reist, M., Von Rechenberg, B., Schawalder, P., Spreng, D., 2001. The effects of doxycycline on nitric oxide and stromelysin

production in dogs with cranial cruciate ligament rupture. *Veterinary Surgery* 30, 132–139.

Jones A., Doherty M., 1996. Intra-articular corticosteroids are effective in osteoarthritis but there are no clinical predictors of response. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 55:829-832

Jones A., Regan M., Ledingham J., Pattrick M., Manhire A., Doherty M., 1993. Importance of placement of intra-articular steroid injections. *BMJ* vol. 307 (20) ,1329-1330.

Jovanovic, D.V., Fernandes, J.C., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F.C., Reboul, P., Laufer, S., Tries, S., Pelletier, J.P., 2001. In vivo dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase by ML-3000 reduces the progression of experimental osteoarthritis: suppression of collagenase 1 and interleukin- 1beta synthesis. *Arthritis and Rheumatism* 44, 2320–2330.

Kealy, R.D., Lawler, D.F., Ballam, J.M., Lust, G., Smith, G.K., Biery, S.E., Olsson, S.E., 1997. Five-year longitudinal study on limited food consumption and development of osteoarthritis in coxofemoral joints of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 210, 222–225.

Kellgren, J.H., Lawrence, J.S., 1957. Radiological assessment of osteoarthrosis. *Annals of the Rheumatic Disease* 16, 494–502.

Kirsch, T., Swoboda, B., Nah, H., 2000. Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralisation and apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 8, 294–302.

Knight, E.V., Kimball, J.P., Keenan, C.M., Smith, I.L., Wong, F.A., Barrett, D.S., Dempster, A.M., Lieuallen, W.G., Panigrahi, D., Powers, W.J., Szot, R.J., 1996. Preclinical toxicity evaluation of tepoxalin, a dual inhibitor of cyclooxygenase and lipoxygenase, in Sprague–Dawley rats and beagles dogs. *Fundamental and Applied Toxicology* 33, 38–48.



Krenn, V., Hensel, F., Kim, H.J., Souto Carneiro, M.M., Starostik, P., Ristow, G., König, A., Vollmers, H.P., Müller-Hermelink, H.K., 1999. Molecular IgV(H) analysis demonstrates highly somatic mutated B cells in synovialitis of osteoarthritis: a degenerative disease is associated with a specific, not locally generated immune response. *Lab Invest.* 79(11):1377-84.

Kusuzaki, K., Sugimoto, S., Takeshita, H., Murata, H., Hashiguchi, T., Nozaki, T., Emoto, K., Ashihara, T., Hirasawa, Y., 2001. DNA cytofluorometric analysis of chondrocytes in human articular cartilages under normal aging or arthritic conditions. *Osteoarthritis and Cartilage* 9, 664–670.

Lajeunesse, D., Martel-Pelletier, J., Fernandes, J.C., Laufer, S., Pelletier, J.P., 2004. Treatment with licofelone prevents abnormal subchondral bone cell metabolism in experimental dog osteoarthritis. *Annals of Rheumatic Diseases* 63, 78–83.

Largo, R., Alvarez-Soria, M.A., Diez-Ortego, I., Calvo, E., Sanchez- Pernaute, O., Egido, J., Herrero-Beaumont, G., 2003. Glucosamine inhibits IL- 1 $\beta$ -induced NF $\kappa$ B activation in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 11, 290– 298.

Laurent U.B.G., JRE Fraser, A Engström-Laurent, 1992. Catabolism of hyaluronan in the knee joint of the rabbit. *Matrix.* 12,130-131.

Li G., Park S.E., DeFrate L.E., 2005. The cartilage thickness distribution in the tibiofemoral joint and its correlation with cartilage-to-cartilage contact. *Clinical Biomechanics* 20: pp.736–744.

Liao JM, Wu T, Li QN, Hu B, Huang LF, Li ZH, Yuan L, Zhong SZ., 2003. Effects of stanozolol on bone mineral density and bone biomechanical properties of osteoporotic rats. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*; 23: 1117-20.

Lipscomb, V.J., Aliabadi, F.S., Lees, P., Pead, M.J., Muir, P., 2002. Clinical efficacy and pharmacokinetics of carprofen in the treatment of dogs with osteoarthritis. *Veterinary Record* 150, 684–689.

Lust, G., 1997. An overview of the pathogenesis of canine hip dysplasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 210, 1443–1445.

MacWilliams P.S., Friedrichs K. R., 2003. Laboratory evaluation and interpretation of synovial fluid. *Veterinary Clinic of Small Animal Practice* 33, 153–178.

Maheu, E., Mazieres, B., Valat, J.P., Loyau, G., Le Loet, X., Bourgeois, P., Grouin, J.M., Rozenberg, S., 1998. Symptomatic efficacy of avocado/soybean unsaponifiables in the treatment of osteoarthritis of the knee and hip: a prospective, randomized, double-blind, prodotto di controllocontrolled, multicenter clinical trial with a six-month treatment period and a two-month followup demonstrating a persistent effect. *Arthritis and Rheumatism* 41, 81–91.

Maini A.A, Maxwell-Scott H., Marks DJ, 2014. Severe alkalosis and hypokalemia with stanozolol misuse. , 32(2):196.

Malinin, T., Ouellette, E.A., 2000. Articular cartilage nutrition is mediated by subchondral bone: a long-term autograft study in baboons. *Osteoarthritis and Cartilage* 8, 483–491.

Marcellin-Little, D.J., Deyoung, D.J., Ferris, K.K., Berry, C.M., 1994. Incomplete ossification of the humeral condyle in spaniels. *Veterinary Surgery* 23, 475–487.

Marks, R., Allegrante, J.P., 2002. Body mass indices in patients with disabling hip osteoarthritis. *Arthritis Research* 4, 246–249.

Marshall K.W., V Manolopoulo, 2000. Amelioration of disease severity by intraarticular hylan therapy in bilateral canine osteoarthritis. *Journal of orthopaedics research*. 18, 416-420.

Marshall, K.W., Manolopoulos, V., Mancner, K., Staples, J., Damyanovich, A., 2000. Amelioration of disease severity by intraarticular hylan therapy in bilateral canine osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research* 18, 416–425.

Martinez, S.A., 1997. Congenital conditions that lead to osteoarthritis in the dog. *Veterinary Clinical North America Small Animal Practitioners* 27, 735–758.

Martinez, S.A., Coronado, G.S., 1997. Acquired conditions that lead to osteoarthritis in the dog. *Veterinary Clinical North America Small Animal Practitioners* 27, 759–775.

Massicotte, F., Lajeunesse, D., Benderdour, M., Pelletier, J.P., Hilal, N., Duval, N., Martel-Pelletier, J., 2002. Can altered production of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, transforming growth factor- $\beta$  and prostaglandin E(2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis and Cartilage* 10, 491–500.

McAlindon T.E., LaValley M. P., Gulin J. P., 2000. Glucosamine and Chondroitin for Treatment of Osteoarthritis: A Systematic Quality Assessment and Meta-analysis. *Journal of American Medical Association*, 283(11):1469-1475.

McLaughlin Jr., R.M., Tillson, D.M., 1994. Flexible external fixation for craniodorsal coxofemoral luxations in dogs. *Veterinary Surgery* 23, 21–30.

Messner K, A Fahlgren, I Ross, B Andersson. 2000. Simultaneous changes in bone mineral density and articular cartilage in a rabbit meniscectomy model of knee osteoarthrosis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 8, 197-199.

Millis D.L. Levine D,. 1997. The role of exercise and physical modalities in the treatment of osteoarthritis. *Journal of veterinary clinics north American small animal practices*, 27, 913-916.

Milner, J.M., Elliott, S.F., Cawston, T.E., 2001. Activation of procollagenases is a key control point in cartilage collagen degradation: interaction of serine and metalloproteinase pathways. *Arthritis and Rheumatism* 44, 2084–2096.

Molecular IgV(H) analysis demonstrates highly somatic mutated B cells in synovitis of osteoarthritis: a degenerative disease is associated with a specific, not locally generated immune response. *Laboratory Investigation* 79, 1377–1384.

Morales T.I. 1993. Articular cartilage organ cultures: in vitro models of matrix homeostasis, resorption, or repair. Joint cartilage degradation: basic and clinical aspects. In Woessner F.J., Marcel Dekker, New York. 261.

Moskowitz, R.W., Goldberg, V.M., 1987. Studies of osteophyte pathogenesis in experimentally induced osteoarthritis. *Journal of Rheumatology* 14, 311–320.

Moskowitz, R.W., Howell, D.S., Goldberg, V.M., Muniz, O., Pita, J.C., 1979. Cartilage proteoglycan alterations in an experimentally induced model of rabbit osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 22, 155–163.

Nakamura, H., Yoshino, S., Kato, T., Tsuruha, J., Nishioka, K., 1999. T-cell mediated inflammatory pathway in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 7, 401–402.

Nalbant, S., Martinez, J.A., Kitumnuaypong, T., Clayburne, G., Sieck, M., Schumacher Jr., H.R., 2003. Synovial fluid features and their relations to osteoarthritis severity: new findings from sequential studies. *Osteoarthritis and Cartilage* 11, 50–54.

Necas J., Bartosikova L., Brauner P., Kolar J., 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, 53, (8): 397–41.

Ni SQ , Zhao W, Wang J, Zeng S, Chen SQ, Jacqz-Aigrain E, Zhao ZY,. 2013. Population pharmacokinetics of ciclosporin in Chinese children with aplastic anemia: effects of weight, renal function and stanozolol administration. *Acta Pharmacol*, 34(7):969-75.

Ni SQ , Zhao W, Wang J, Zeng S, Chen SQ, Jacqz-Aigrain E, Zhao ZY., 2013. Population pharmacokinetics of ciclosporin in Chinese children with aplastic anemia: effects of weight, renal function and stanozolol administration. *Acta Pharmacol Sin*, 34(7):969-75.

Nikel R., Schummer A., Seiferle E., 1991. Sistema scheletrico, osteologia in Nikel, Trattato di anatomia degli animali domestici, I° volume, Casa editrice Ambrosiana, Milano : pp.12-186.

Oakley, P., Lassere, M.N., Portek, I., Ghosh, P., Kirkham, B.W., Murrel, G.A., Wulf, S., Appleyard, R.C., 2004. Biomechanical, histologic and macroscopic assessment of articular cartilage in a sheep model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 12, 667–679.

Olson M. E., Morck D. W., Quinn B. K., 2000. The effect of stanozolol on 15nitrogen retention in the dog. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 64: 246-248.

Patwaria P., Kurza B., Sandyb J. D., Grodzinskya A. J., 2000. Mannosamine Inhibits Aggrecanase-Mediated Changes in the Physical Properties and Biochemical Composition of Articular Cartilage. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 374, (1) , 1 ,79–85.

Pavelka, K., Gatterova, J., Olejarova, M., Machacek, S., Giacobelli, L.C., Rovati, L.C., 2002. Glucosamine sulphate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, controlled, double-blind study. *Archives of Internal Medicine* 162, 2113–2123.

Pearson, W., Orth, M.W., Lindinger, M.I., 2009. Evaluation of inflammatory responses induced via intra-articular injection of interleukin-1 in horses receiving a dietary nutraceutical and assessment of the clinical effects of long-term nutraceutical administration. *American Journal of Veterinary Research* 70, 848–861.

Pelagalli G.V., Botte V., 1999. Articolazioni in Pelagalli, *Anatomia veterinaria sistematica e comparata*, vol 1°, 3th edition, Ermes Editore: pp. 97-129.

Pelletier, J., Jovanovic, D., Fernandes, J.C., Manning, P., Connor, M.G., Currie, M.G., Martel-Pelletier, J., 1999. Reduction in the structural changes of

experimental osteoarthritis by a nitric oxide inhibitor. *Osteoarthritis and Cartilage* 7, 416–418.

Pelletier, J.P., Caron, J.P., Evans, C., Robbins, P.D., Georgescu, H.I., Jovanovic, D., Fernandes, J.C., Martel-Pelletier, J., 1997. In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin-1 receptor antagonist using gene therapy. *Arthritis and Rheumatism* 40, 1012–1019.

Pelletier, J.P., Jovanovic, D.V., Lascau-Coman, V., Fernandes, J.C., Manning, P.T., Connor, J.R., Currie, M.G., Martel-Pelletier, J., 2000a. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis and Rheumatism* 43, 1290–1299.

Pelletier, J.P., Lajeunesse, D., Jovanovic, D.V., Lascau-Coman, V., Jolicoeur, F.C., Hilal, G., Fernandes, J.C., Martel-Pelletier, J., 2000b. Carprofen simultaneously reduces progression of morphological changes in cartilage and subchondral bone in experimental dog osteoarthritis. *Journal of Rheumatology* 27, 2893–2902.

Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J., 1989. Protective effects of corticosteroids on cartilage lesions and osteophyte formation in the Pond-Nuki dog model of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 32, 181–193.

Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J., Abramson, S.B., 2001. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis and Rheumatism* 44, 1237–1247.

Pelletier, J.P., Mineau, F., Raynauld, J.P., Woessner Jr., J.F., Gunja-Smith, Z., Martel-Pelletier, J., 1994. Intraarticular injections with methylprednisolone acetate reduce osteoarthritic lesions in parallel with chondrocyte stromelysin synthesis in experimental osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 37, 414–423.

Pieretti S, Mastriota M, Tucci P, Battaglia G, Trabace L, Nicoletti F, Scaccianoce S. 2013. Brain nerve growth factor unbalance induced by anabolic androgenic steroids in rats. *Med Sci Sports Exerc.* 45(1):29-35.

Piermattei D., Flo G., DeCamp C., 2006. The elbow joint in Brinker, Piermattei, and Flo's Handbook of small animal orthopedics and fracture repair, 4th Edition, Elsevier Saunders editore, St. Louis, Missouri; 325-358.

Piermattei D.L., Johnson K.A., 2004. The scapula and shoulder joint in Piermattei's An atlas of surgical approaches to the bones and joints of the dog and cat. 4th edition, Elsevier Saunders editore, Philadelphia, Pennsylvania : pp. 112-147.

Pinna S., Landucci F., Tribuiani A. M., Carli F., Venturini A., 2013. The effects of pulsed electromagnetic field in the treatment of osteoarthritis in dogs: clinical study, *Pakistan Veterinary Journal*, 33, pp. 96 - 100.

Piperno, M., Reboul, P., Hellio Le Graverand, M.P., Peschard, M.J., Annefeld, M., Richard, M., Vignon, E., 2000. Glucosamine sulphate modulates dysregulated activities of human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage* 8, 207–212.

Plumb D. C., 2011. Stanazolol in Plumb's Veterinary Drug Handbook, 7th edition, Willey Blackwell, pp. 445-446.

Pratta M.A., MD Tortorella, EC Arner. 2000. Age-related changes in aggrecan glycosylation affect cleavage by aggrecanase. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 39096-39098.

Pritzker K. P. H., Gay S., Jimenez S. A, Ostergaard K., Pelletier J.-P., Revell P.A., Salter D., Path F.R.C .and van den Berg W. B., 2006. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *OsteoArthritis and Cartilage* , 14, 13-29.

Qvistgaard E., Christensen R., Torp-Pedersen S. and Bliddal H., 2006. Intra-articular treatment of hip osteoarthritis: a randomized trial of hyaluronic acid, corticosteroid, and isotonic saline. *OsteoArthritis and Cartilage*, 14, 163-170.

Radin, E.L., Rose, R.M., 1986. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clinica Orthopaedica*, 34–40.

Ravanti L., Kahari W. 2000. Matrix metalloproteinases in: Wound repair (Review). *Int. Journal of Molecular medicine*. 6, 391-397.

Read, R.A., Cullis-Hill, D., Jones, M.P., 1996. Systemic use of pentosan polysulphate in the treatment of osteoarthritis. *Journal of Small Animal Practice* 37, 108–114.

Reginster, J.Y., Deroisy, R., Rovati, L.C., Lee, R.L., Lejeune, E., Bruyere, O., Giacovelli, G., Henrotin, Y., Dacre, J.E., Gossett, C., 2001. Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, controlled clinical trial. *Lancet* 357, 251–256.

Richy, F., Bruyere, O., Ethgen, O., Cucherat, M., Henrotin, Y., Reginster, J.Y., 2003. Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: a comprehensive meta-analysis. *Archives of Internal Medicine* 163, 1514–1522.

Ross, M.W., 2003. Movement. In: Ross, M.W., Dyson, S.J. (Eds.), *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. WB Saunders, St. Louis, pp. 60–73.

Rovetta, G., Monteforte, P., Molfetta, G., Balestra, V., 2002. Chondroitin sulphate in erosive osteoarthritis of the hands. *International Journal of Tissue Reaction* 24, 29–32.

Sakkas, L.I., Platsoucas, C.D., 2002. Role of T cells in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 46, 3112–3113.

Salari R., Dondi M., Bianchi E., Cani V., Predieri G.P., Zannetti G., Stanazolol inhibits Nitric Oxide Production by Horse Chondrocyte Cells Culture; *Bone*, Official Journal of the International Bone and Mineral Society, vol. 34, suppl. 1



Saleri, R., Dondi, M., Bianchi, E., 2004. Stanazolol inhibits nitric oxide production by horse chondrocyte cell culture. *Bone*, Official Journal of the International Bone and Mineral Society 34 (Suppl. 1), 34–73.

Salinardi B. J., Roush J. K., Schermerhorn T., Mitchell K. E., 2006. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in serum and synovial fluid of osteoarthritic dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 1 ,(1), 49-55.

Samoy Y., Van Ryssen B., Gielen I., Walschot N., Van Bree H., 2006. Review of the literature Elbow incongruity in the dog. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 19: 1-8.

Sanchez, C., Mateus, M.M., Defresne, M.P., Crielaard, J.M., Reginster, J.Y., Henrotin, Y.E., 2002. Metabolism of human articular chondrocytes cultured in alginate beads. Long term effects of interleukin 1beta and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Journal of Rheumatology* 29, 772–782.

Sanchez, C., Mathy-Hartert, M., Deberg, M.A., Ficheux, H., Reginster, J.Y., Henrotin, Y.E., 2003. Effects of rhein on human articular chondrocytes in alginate beads. *Biochemical Pharmacology* 65, 377–388.

Sandell L.J., 1994. In situ expression of collagen and proteoglycan genes in notochord and during skeletal development and growth. *Microscopic research technique*. 28, 470-472.

Schmidt T. A., Gastelum N. S., Nguyen Q. T., Schumacher B. L., and Sah R. L., 2007. Boundary Lubrication of Articular Cartilage, Role of Synovial Fluid Constituents *Arthritis and Rheumatism* 56, (3), 882–891.

Schulz K., Krotscheck U., 2003. Canine elbow dysplasia in *Slatter Textbook of Small animal Surgery*, Vol II; Saunders, Philadelphia; 1927-1952.

Schulz K., Krotscheck U., 2003. Canine elbow dysplasia in *Slatter Textbook of Small animal Surgery*. Vol II; Saunders, Philadelphia, 1927-1952.

Setnikar, I., Giacchetti, C., Zanolo, G., 1986. Pharmacokinetics of glucosamine in the dog and in man. *Arzneimittelforschung* 36, 729– 735.

Setton LA, DM Elliott, VC Mow, 1999. Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. *Osteoarthritis and Cartilage*. 7,2-5.

Shibakawa, A., Aoki, H., Masuko-Hongo, K., Kato, T., Tanaka, M., Nishioka, K., Nakamura, H., 2003. Presence of pannus-like tissue on osteoarthritic cartilage and its histological character. *Osteoarthritis and Cartilage* 11, 133–140.

Simon S.R., Radin E.L. 1997. Biomechanics of joints. Text book of reumatology. Vol, 1. 5th ed WB Saunders. Philadelphia pag. 86.

Small, M., Beastall, G.H., Semple, C.G., Cowan, R.A., Forbes, C.D., 1984. Alteration of hormone levels in normal males given the anabolic steroid stanozolol. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 21, 49–55.

Smith GN , SL Myers, KD Brand, 1999. Effect of intraarticular hyaluronan injection in experimental canine osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 41, 976-980.

Smith Jr., G.N., Mickler, E.A., Myers, S.L., Brandt, K.D., 2001. Effect of intraarticular hyaluronan injection on synovial fluid hyaluronan in the early stage of canine post-traumatic osteoarthritis. *Journal of Rheumatology* 28, 1341–1346.

Smith Jr., G.N., Myers, S.L., Brandt, K.D., Mickler, E.A., 1998. Effect of intraarticular hyaluronan injection in experimental canine osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 41, 976–985.

Smith Jr., G.N., Myers, S.L., Brandt, K.D., Mickler, E.A., Albrecht, M.E., 1999. Diacerhein treatment reduces the severity of osteoarthritis in the canine cruciate-deficiency model of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 42, 545–554.

Sokoloff, L., 1993. Microcracks in the calcified layer of articular cartilage. Archives of Pathology and Laboratory Medicine 117, 191–195.

Sorrell AM , Shand JH, Tonner E, Gamberoni M, Accorsi PA, Beattie J, Allan GJ, Flint DJ., 2006. Insulin-like growth factor-binding protein-5 activates plasminogen by interaction with tissue plasminogen activator, independently of its ability to bind to plasminogen activator inhibitor-1, insulin-like growth factor-I, or heparin. J Biol Chem. Apr 21;281(16):10883-9.

Spadari A. Romagnoli N., Predieri P.G., Borghetti P, Cantoni A.M., Corradi A. 2013. Effects of intraarticular treatment with stanozolol on synovial membrane and cartilage in an ovine model of osteoarthritis. Research in Veterinary Science. 94, 379-387.

Studer, R., Jaffurs, D., Stefanovic-Racic, M., Robbins, P.D., Evans, C.H., 1999. Nitric oxide in osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage 7, 377–379.

Tapadinhas, M.J., Rivera, I.C., Bignamini, A.A., 1982. Oral glucosamine sulphate in the management of arthrosis: report on a multicentre open investigation in Portugal. Pharmatherapeutica 3, 157–168.

Tester AM, MZ Ilic, HC Robinson, CJ Handley, 1999. Metabolic processing of newly synthesized link protein in bovine articular cartilage explant cultures. Matrix biology. 18,65-67.

Tetlow, L.C., Adlam, D.J., Woolley, D.E., 2001. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. Arthritis and Rheumatism 44, 585–594.

Todhunter R.T, Lust G., 1994. Polysulfated glycosaminoglycan in the treatment of osteoarthritis. Journal of American Veterinary Medical Association. 204, 1245-1249.

Todhunter RJ LA Yeh, A Sheldon. 1995. Effects of stromelysin activity on proteoglycan degradation of canine articular cartilage explants. American journal of veterinary research. 56, 1241-1246.

Towheed, T.E., Anastassiades, T.P., 1999. Glucosamine therapy for osteoarthritis. Journal of Rheumatology 26, 2294–2297.

Van Susante JLC, P Buma. 2000. Responsiveness of bovine chondrocytes to growth factors in medium with different serum concentrations. Journal of Orthopaedic Research. 18, 68-73.

Vandeweerdt J.-M., Coisnon C., Clegg P., Cambier C., Pierson A., Hontoir F., Saegerman C., Gustin P., and Buczinski S., 2012. Systematic Review of Efficacy of Nutraceuticals to Alleviate Clinical Signs of Osteoarthritis. J Vet Intern Med, 26, 448–456.

Venn, G., Nietfeld, J.J., Brennan, F.M., Arner, E., Covington, M., Billingham, M.E., Hardingham, T.E., 1993. Elevated synovial fluid levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor associated with early experimental canine osteoarthritis. Arthritis and Rheumatology 36, 819–826.

Verbruggen, G., Goemaere, S., Veys, E.M., 2002. Systems to assess the progression of finger joint osteoarthritis and the effects of disease modifying osteoarthritis drugs. Clinical Rheumatology 21, 231–243.

Vilar J.M., Morales M, Santana A., Spinella G, Rubio M, Cuervo B, Cugat R, Carrillo J M. 2013. Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs. BMC Veterinary Research 9:131.

Wang, J., Verdonk, P., Elewaut, D., Veys, E.M., Verbruggen, G., 2003. Homeostasis of the extracellular matrix of normal and osteoarthritic human

articular cartilage chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage* 11, 801–809.

Westacott, C.I., Webb, G.R., Warnock, M.G., Sims, J.V., Elson, C.J., 1997. Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone. *Arthritis Rheumatism* 40, 1282–1291.

Willoughby, D.A., Moore, A.R., Colville-Nash, P.R., 2000. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* 355, 646–648.

Wright, J.K., Smith, A.J., Cawston, T.E., Hazleman, B.L., 1989. The effect of anabolic steroid, stanozolol, on the procollagenase by human synovial and skin fibroblasts. *Agents and Actions* 28, 1193–1197.

Yamada, M., Aramaki, S., Kurosawa, M., Kijima-Suda, I., Saito, K., Nakazawa, H., 2008. Simultaneous doping analysis of main urinary metabolites of anabolic steroids in horse by ion-trap gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical Sciences* 24, 1199–1204.

Yaron, M., Shirazi, I., Yaron, I., 1999. Anti-interleukin-1 effects of diacerhein and rhein in human osteoarthritic synovial tissue and cartilage cultures. *Osteoarthritis and Cartilage* 7, 272–280.

Yasuda, T., Poole, A.R., 2002. A fibronectin fragment induces type II collagen degradation by collagenase through an interleukin-1-mediated pathway. *Arthritis and Rheumatism* 46, 138–148.

You, Y., Uboh, C.E., Soma, L.R., Guan, F., Li, X., Rudy, J.A., Liu, Y., Chen, J., 2009. Ultraperformance liquid chromatography/tandem mass spectrometry in highthroughput detection, quantification and confirmation of anabolic steroids in equine plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23, 2035–2044.

Yuan, G.H., Masuko-Hongo, K., Kato, T., Nishioka, K., 2003. Immunologic intervention in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 48, 602–611. Y. Henrotin et al. / *The Veterinary Journal* 170 (2005) 113–123.

Zannetti, G., 2004. Impiego clinico classico dello stanazololo in terapia. ACME, Cavriago.

Zhu SY , Li YH, Ma HM, Pan SN, Chen HS, DU ML, 2009. Stanazolol activates the cross-talk of estrogen receptor alpha-insulin-like growth factor-1 receptor-extracellular-signal regulated kinase 1/2 in the growth plate chondrocytes of estrogen-inhibited adolescent rats in vitro. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 47(10):774-8.

Zhu SY, Li YH, Ma HM, Huang TT, Luo HB, Dou J, Du ML, 2011. Stanazolol regulates proliferation of growth plate chondrocytes via activation of ERalpha in GnRHa-treated adolescent rats. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 24, 275-281.

## APPENDICE 1

# STANDARD OPERATING PROCEDURE (SOP) N°1

<b>TITOLO: Protocollo radiografico di valutazione dell'articolazione del gomito e del ginocchio</b>
<b>SCOPO:</b> descrivere le modalità di esecuzione delle radiografie necessarie a valutare lo stato delle articolazioni in esame.

QUALIFICA	FIRMA	DATA
QUALITY ASSURANCE		
MONITOR		
SPONSOR		
SPERIMENTATORE		

LISTA DI DISTRIBUZIONE	
N° COPIE	FUNZIONE/UNITA'
	Responsabile per lo Sponsor
	Responsabile dello studio
	Monitor
	Sperimentatore

## INDICE

- |   |       |
|---|-------|
| 1. Scopo  | pag 2 |
| 2. Protocollo radiografico di valutazione dell'articolazione del gomito | pag.2 |

## 1. Scopo

Descrivere le modalità di esecuzione delle radiografie necessarie a valutare lo stato delle articolazioni in esame

## 2. Protocollo radiografico di valutazione dell'articolazione del gomito

L'esame radiografico deve essere effettuato in sedazione profonda, secondo il protocollo stabilito dall'International Elbow Working Group (IEWG).

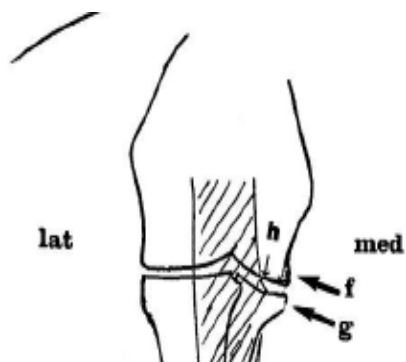
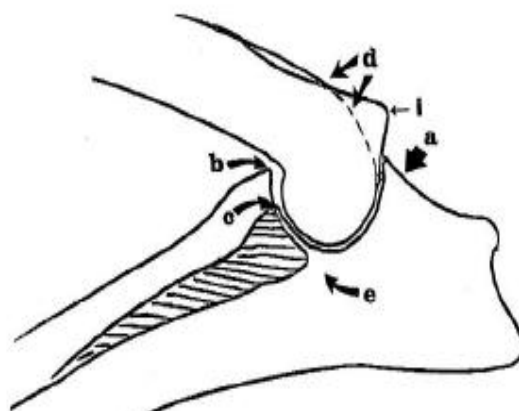
Devono essere eseguite due proiezioni dell'articolazione interessata:

1. PROIEZIONE MEDIOLATERALE: mantenuto in flessione di circa 45°, senza pronazione né supinazione dell'estremità dell'arto, con sovrapposizione del profilo mediale e laterale del condilo omerale e fascio radiogeno centrato su di esso.
2. PROIEZIONE ANTEROPOSTERIORE, ovvero cranio-caudale obliqua con 15° circa di pronazione ed arto esteso.



Localizzazione di lesioni osteoartrosiche per stimare il grado di OA a carico del gomito secondo i dettami del IEWG.





Legenda:

- a. superficie prossimale del processo anconeo
- b. aspetto craniale della testa del radio
- c. bordo craniale del processo coronoideo mediale
- d. superficie caudale della cresta cresta condilare caudale
- e. sclerosi della eminenza ulnare alla base del processo coronoideo mediale
- f. superficie mediale dell'epicondilo mediale
- g. bordo mediale del processo coronoideo mediale
- h. dentellatura o irregolarita' dell'osso sub condrale: (simile a) OCD

OA	0	1	2	3
Localizzazione (fig. 1) / mm				
a				
b				
d				
f				
g				

Architettura/sclerosi				
C				
e				
Totale OA				

Tabella 1: localizzazione processi osteofitici articolari e modificazioni osso subcondrale

Punteggio	Grandezza osteofiti/sclerosi
0	Articolazione normale Normale
1	Osteofiti <2mm Sclerosi lieve
2	Osteofiti 2-5 mm Sclerosi media gravita'
3	Osteofiti >5 mm Sclerosi grave'

Tabella 2: punteggio da inserire in tabella 1 a seconda del grado di gravità dell'osteoartrosi

Ad ogni singola modificazione dei punti indicati viene valutato singolarmente attribuendo un punteggio di valore intero compreso tra 0 e 3 in base al diametro delle formazioni osteo/entesio-fitiche. Articolazione normale [0]; lieve alterazione [2]; media alterazione [2]; grave alterazione [4]. I punteggi ottenuti per ogni singolo parametro vengono sommati al fine di ottenere il punteggio complessivo del grado di osteo-artrosi, che risulterà compreso tra 0-21. La valutazione radiografica deve essere effettuata da due differenti veterinari e sarà considerata valida la media dei due punteggi raccolti.

La valutazione in oggetto dovrà essere effettuata all'inizio del trattamento (fase d'inclusione) e al termine del trattamento (a 60 giorni). Sarà valutata la differenza di punteggio tra le due fasi.

Ogni singolo parametro viene valutato singolarmente attribuendo un punteggio di valore intero compreso tra 0 e 3. Articolazione normale [0]; lieve alterazione [2]; media alterazione [2]; grave alterazione [4]. I punteggi ottenuti per ogni singolo parametro vengono sommati al fine di ottenere il punteggio complessivo del grado di osteo-artrosi, che risulterà compreso tra 0-90. La valutazione radiografica deve essere effettuata da due differenti veterinari e sarà considerata valida la media dei due punteggi raccolti. *Tabella secondo Connie R. Hurley, dvm; Douglas L. Hammer, dvm, dacvs; Susan Shott, phd, (J Am Vet Med Assoc 2007; 230:1674–1679)*